

低温处理对不同苹果砧木叶片生理指标的影响

冯章丽¹, 刘 畅¹, 赵德英², 刘延杰¹, 顾广军¹, 程显敏¹, 卜海东¹

(1. 黑龙江省农业科学院 牡丹江分院, 黑龙江 牡丹江 157041; 2. 中国农业科学院 果树研究所, 辽宁 兴城 125100)

摘要:为探讨不同苹果砧木的抗寒性,在低温处理条件下,比较分析了12种苹果砧木的抗寒生理指标的变化规律。结果表明:12份参试材料中山丁子的蛋白质含量、可溶性淀粉含量以及SOD活性最高;MD001的可溶性糖含量和CAT活性最高,GM310的POD活性最高,表明山丁子、MD001和GM310的抗寒性较强。进一步方差分析表明,不同砧木叶片间SOD活性、POD活性、CAT活性、可溶性糖含量以及可溶性蛋白质含量差异均达到极显著水平($P < 0.01$),即不同砧木的抗寒性存在极显著差异。

关键词:低温处理;苹果砧木;叶片;生理指标

中图分类号:S661.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)05-0087-05

苹果在近几年的农业生产结构调整中发挥了重要的作用,随着人们对苹果需求量的不断增加,生产规模日渐扩大。但我国的果树常会遭受不同低温的伤害,损失严重。国内的专家在引入国外抗寒砧木的同时在抗寒砧木的选育上也做了大量工作,选出了一些优良砧木。许多学者对苹果砧木的抗寒机理、抗寒性鉴定、抗寒资源的筛选与评价等领域进行研究并取得了良好的进展。SOD可以保护膜结构,使植物能在一定程度上忍耐、减缓或抵抗逆境胁迫。通过检测SOD活性,比较植株间的抗寒性差异。桧木属植物中,在不同温度处理下检测叶片的SOD,证明处理温度与叶片内的SOD活性正呈相关^[1]。POD的主要作用包括细胞生长发育的控制、合成细胞壁结构成分、参与

生理代谢和清除活性氧等。因此,可以通过检测POD含量的变化,比较品种间抗寒性的强弱。研究表明,大叶女贞在低温条件下,叶片POD酶活性随着处理温度的下降逐渐降低^[2]。同时,植物的抗寒性与可溶性糖及可溶性蛋白含量呈正相关^[3-4]。该研究目的是对12种苹果砧木在低温下对叶片生理生化指标进行测定与分析,探讨叶片酶活性的变化对砧木的影响,为苹果砧木的抗寒性筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2011年秋于吉林果树所、辽宁果树所和中国农业科学院果树研究所引进砧木作为试材(见表1),2012年4月枝接于黑龙江省农业科学院牡丹

表1 试验材料及编号

Table 1 Materials and number in experiment

序号 No.	品种(系) Varieties	序号 No.	资源名称 Names	序号 No.	品种(系) Varieties
1	T337	5	MM111	9	GV16
2	P60	6	辽砧2	10	山丁子
3	GM256	7	GM310	11	Pajamal1
4	P1	8	MD001	12	Pajamal2

收稿日期:2014-02-16

基金项目:国家现代苹果产业技术体系专项经费资助项目(CARS-28-23)

第一作者简介:冯章丽(1984-),女,内蒙古自治区赤峰市人,硕士,研究实习员,从事寒地果树遗传育种与种质资源研究工作。

通讯作者:刘延杰(1957-),男,硕士,研究员,从事果树育种和栽培技术等研究。

江分院试验基地。根砧选山丁子,接穗的沙藏、枝接及苗木按常规管理。

1.2 方法

于果实成熟期在一年生枝条上选取生长方向一致的枝条,在每个枝条中部选取2~3片叶,共

计8片叶,立即放入冰盒中,迅速带回实验室擦干净,放入海尔BD-492HC低温冰箱中,0℃处理12 h保存待用,准备进行生理生化指标的测定。

1.2.1 可溶性蛋白质含量测定 准确称取0.1 g叶片,放入研钵中,加入5 mL蒸馏水在冰浴中研成匀浆,离心($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),将上清液倒入10 mL容量瓶,再向残渣中加入2 mL蒸馏水,悬浮后再离心10 min,合并上清液,定容至10 mL刻度。另取1支具塞试管,准确加入0.1 mL样品提取液,再加入0.9 mL蒸馏水,与5 mL的考马斯亮蓝G-250试剂混合均匀后放置2 min,然后在595 nm波长下快速进行比色,记录吸光度值。

1.2.2 可溶性糖和淀粉含量测定 取植物叶片在110℃烘箱中烘15 min,然后调至70℃过夜。干叶片磨碎后称取500 mg样品倒入10 mL刻度试管内,加入4 mL 80%酒精,置于80℃水浴中不断搅拌40 min,离心,收集上清液,残渣加2 mL 80%酒精重复提取2次,合并上清液。在上清液中加10 mg活性炭,80℃脱色30 min,定容至10 mL,过滤后吸取上述酒精提取液1 mL,加5 mL蒽酮试剂混合,沸水浴煮10 min,取出冷却。在620 nm处测OD值。从标准曲线上得到提取液中糖的含量。

测糖后离心管中的残渣用10 mL去离子水转移到试管中,进行沸水浴15 min,然后再加 $9.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸2 mL,充分提取15 min。然后冷却过滤,用去离子水定容至25 mL容量瓶中。吸取0.2 mL提取液于试管中,依次加入1.8 mL去离子水、0.5 mL 2%蒽酮乙酸乙酯及5 mL 98%的浓硫酸,然后在振荡器上充分振荡混匀立即投入到沸水浴保温1 min,自然冷却后在620 nm波长下测定OD值。

1.2.3 SOD、POD、CAT活性的测定 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[5]。过氧化物酶(POD)活性测定按Rao(19%)的方法($A=470\text{ nm}$),记录愈创木酚被氧化的速率。过氧化氢酶(CAT)活性参照Aebi的方法,连续记录240 nm吸收值的变化(用石英比色杯),以吸光值变化0.001为一个酶单位。

1.2.4 数据分析 数据采用Excel 2003进行处理,利用DPS 7.05进行方差分析,并利用Graph-

pad prism 5 绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 不同矮化砧木类型叶片抗寒生理生化指标变化

低温处理后,12份参试矮化砧木类型叶片抗寒生理生化指标发生了显著的变化。由图1A可知,参试12份苹果砧木中,山丁子的蛋白质含量最高,其次是MD001和GM301,最小的为T337。通过在低温处理,砧木枝条抗寒性强的可溶性蛋白含量还是高于砧木枝条抗寒性弱的,山丁子的蛋白质含量是T337的3倍。由图1B可看出,MD001的可溶性糖含量最高,而山丁子、GM310总体上也要高于P60、M111、T337和Pajamal1。由图1C表明,在低温条件下,抗寒力较强的砧木山丁子、MD001、GM310、辽砧2、GM256的淀粉含量明显高于其它砧木,具有较高的储藏养分。经过低温处理后12个样品的SOD活性变化幅度不大,但是从图1D中仍然可以看出,整体呈下降趋势,山丁子和MD001的SOD活性要高于其它砧木。在POD研究方面,过氧化物酶的活性与抗寒性之间密切相关,抗寒品种的POD活性比不抗寒品种高。从图1E可以看出GM310、GM256的POD活性明显高于其它砧木。图1F中可以看出12个砧木当中山丁子、MD001、GV16、GM256的CAT活性要高于其它砧木。P1、P60、Pajamal2的CAT活性最低,MD001CAT活性是P60的7倍。

2.2 各生理指标间的相关性分析

对所有供试材料生理生化指标进行方差分析可看出,在不同砧木资源间SOD活性、POD活性、CAT活性、蛋白质含量、可溶性糖含量以及可溶性淀粉含量等单项生理生化指标差异均达到极显著水平($P<0.01$)。进一步对试验材料的各项生理生化指标的测定值进行相关性分析。由表2可以看出,山丁子蛋白质含量与辽砧2、GM256、Pajamal1、P1、P60、Pajamal2、M111以及T337之间存在极显著差异,而T337除了M111外,与其它10个种苹果砧木中都存在极显著差异。12种苹果砧木中,MD001的可溶性糖含量与其它11个砧木存在极显著差异,而其它11个砧木之间差异没有到达极显著水平。GM310、GV16以及

GM256 三者淀粉含量存在极显著差异。山丁子和 MD001 的 SOD 含量与 P60、M111 以及 T337 之间存在极显著差异,但是山丁子和 MD001 之间以及 P60、M111 和 T337 之间 SOD 活性差异不显著。GM310 的 POD 活性与山丁子、MD001、辽砧 2、Pajamal1、P1、P60、Pajamal2、M111 以及 T337 之间存在极显著差异。而 MD001 的 CAT 活性与 GM310、GM256、Pajamal1 以及 T337 之间存在极显著差异,与辽砧 2、P1、P60、Pajamal2 以及 M111 之间也存在极显著差异。

同时,对 12 份砧木的抗寒性指标进行比较分析发现,山丁子的蛋白质含量和 SOD 活性均最高;MD001 的可溶性糖含量以及 CAT 活性最高;而 GM310 的 POD 活性最高,且这 3 个材料的其它抗寒指标也都处于较高水平,由此可知,山丁子、MD001 以及 GM310 的抗寒性较好。而 GV16、GM256、P1、P60、M111 以及 T337 的抗寒性指标均处于较低水平,表明这 6 个砧木材料的抗寒性较差。

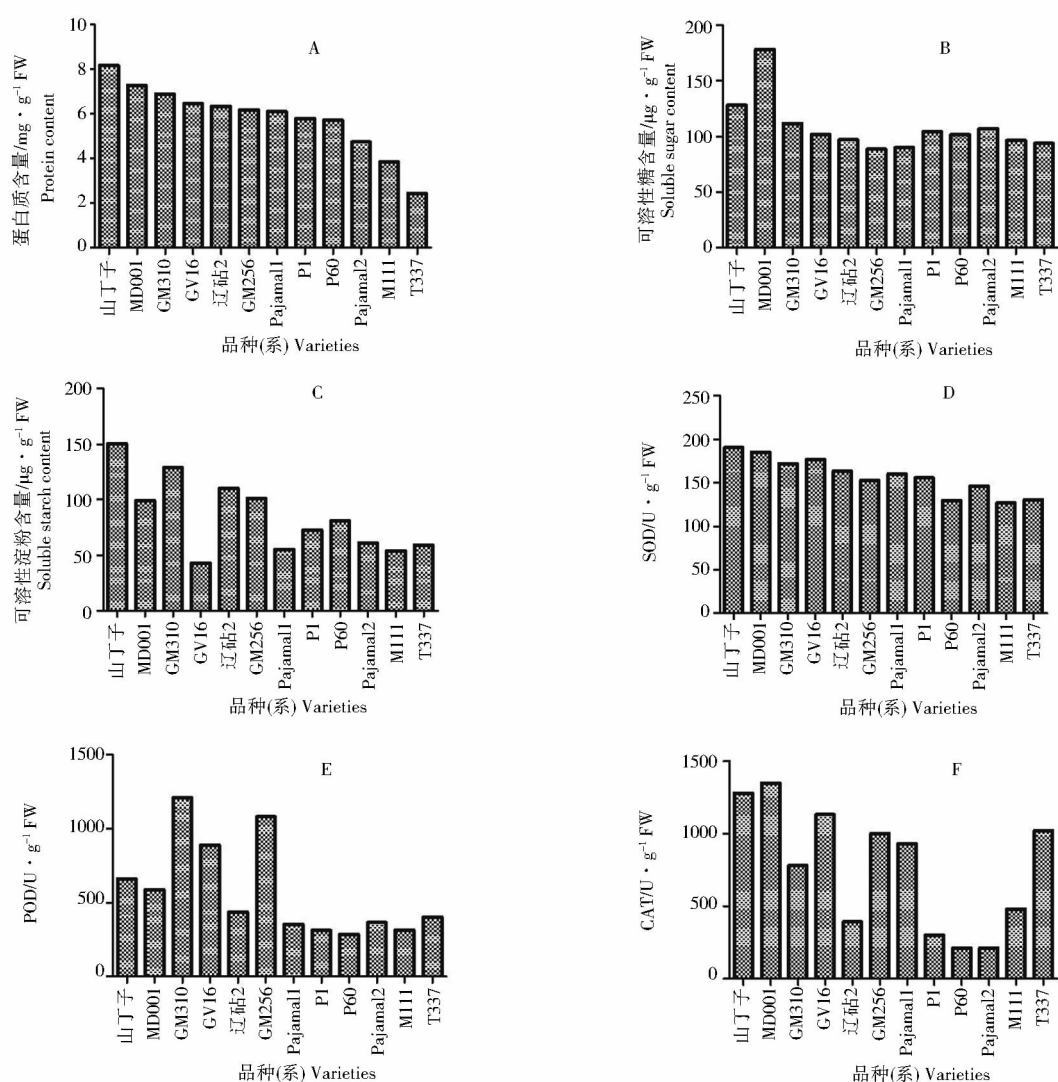


图 1 不同砧木类型抗寒生理生化指标含量变化

Fig. 1 Change of physiological and biochemical indexes for cold resistance of different stocks

表 2 低温条件对苹果矮化砧木资源 6 个生理生化指标影响

Table 2 Effects on 6 physiological and biochemical indexes in apple dwarfing rootstock resources under low temperature treatment

砧木名称 Varieties	蛋白质含量/ mg·g ⁻¹ FW Protein content	可溶性糖含量/ μg·g ⁻¹ FW Soluble sugar content	可溶性淀粉 含量/μg·g ⁻¹ FW Soluble starch content	SOD/ U·g ⁻¹ FW	POD/ U·g ⁻¹ FW	CAT/ U·g ⁻¹ FW
山丁子 Shandingzi	8.15 A	128.46 B	150.59 BC	190.65 A	660.00 BC	1280.00 AB
MD001	7.26 AB	178.10 A	99.31 BC	185.41 A	586.67 BC	1350.00 A
GM310	6.89 AB	111.94 B	129.14 A	172.12 AB	1209.33 A	780.00 B
GV16	6.45 AB	101.84 B	43.15 F	176.50 AB	888.00 AB	1130.00 AB
辽砧 2 Liaozen 2	6.32 BC	96.87 B	110.33 AB	163.42 AB	434.67 C	390.00 C
GM256	6.18 BC	88.51 B	101.10 B	152.59 AB	1082.00 A	1000.00 B
Pajamal1	6.10 BC	90.09 B	55.46 EF	160.21 AB	353.33 C	930.00 B
P1	5.79 BC	104.48 B	72.56 DE	155.64 AB	310.67 C	300.00 C
P60	5.71 BC	101.59 B	80.68 CD	129.47 B	282.67 C	210.00 C
Pajamal2	4.72 CD	106.96 B	60.85 DEF	146.06 AB	362.67 C	210.00 C
M111	3.85 DE	96.46 B	53.92 EF	126.85 B	313.33 C	480.00 C
T337	2.43 E	93.98 B	59.31 EF	130.38 B	400.00 C	1020.00 B

注:同列中不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Note:Different capital letters mean significant difference at 0.01 level($P<0.01$).

从表 3 可以看出,6 个生理生化指标之间都存在正相关,其中蛋白质含量、可溶性糖以及可溶性淀粉含量与 SOD 活性相关性最高,分别为 0.872 6、0.523 8 和 0.472 0。而 CAT 活性分别与 SOD 活性和 POD 活性相关性最高为 0.656 7 和 0.492 1。

表 3 6 个生理生化指标的相关系数矩阵

Table 3 Correlation matrix of six physiological and biochemical indexes

项目 Items	蛋白质含量 Protein content	可溶性糖含量 Soluble sugar content	可溶性淀粉含量 Soluble starch content	SOD 活性 SOD activity	POD 活性 POD activity	CAT 活性 CAT activity
蛋白质含量 Protein content	1.0000					
可溶性糖含量 Soluble sugar content	0.4452	1.0000				
可溶性淀粉含量 Soluble starch content	0.5749	0.3255	1.0000			
SOD 活性 SOD activity	0.8726	0.5238	0.4720	1.0000		
POD 活性 POD activity	0.3997	0.0164	0.4477	0.5056	1.0000	
CAT 活性 CAT activity	0.3766	0.4367	0.1085	0.6567	0.4921	1.0000

注:相关系数临界值 $\alpha=0.01$ 时, $r=0.707\ 9$ 。

Note:When the critical value of correlation coefficient was 0.01, $r=0.707\ 9$.

3 结论与讨论

植物经低温处理后,其体内的蛋白质含量,可溶性糖含量以及可溶性淀粉含量等相关生理生化指标发生了显著的变化,对这些指标的测定,可以

直接反映出其抗寒性的强弱。许多学者对可溶性蛋白质含量和果树抗寒锻炼的关系进行研究,发现两者密切相关。蛋白质含量的增加可以提高细胞内的束缚水含量同时降低冰点,蛋白质含量的

增加还可以加强细胞的保水能力,同时可能引起细胞液过冷的形成,对抗寒性的研究水平提高具有重要作用。而可溶性糖不仅可以降低细胞质的冰点,还能促进 ABA 积累,诱导蛋白质的合成,从而提高植物的抗寒性^[6-7]。通常植物在低温条件下,其生理表现为糖分的积累和增加,并且束缚水含量变化与这种变化规律有较好相似性,抗寒性弱的植物其可溶性糖含量总是低于抗寒性强的植物。同时可溶性糖的含量同抗寒性有相似现象存在,抗寒性强的品种的可溶性糖的含量较抗寒性弱的品种高。因此,该研究选择了蛋白质含量、可溶性糖含量、可溶性淀粉含量、SOD 活性、POD 活性以及 CAT 活性 6 个与抗寒性强弱密切相关的生理生化指标来对 12 份参试材料的抗寒性进行检测,以期对于苹果育种中抗寒性砧木选择提供指导。

赵玲玲等对低温胁迫下 4 种苹果砧木叶片多糖的变化进行分析,结果表明山丁子具有较强的抗寒性^[8]。在该研究中,通过对试验材料进行各项生理生化指标的测定,可以看出在参试的 12 份砧木中,山丁子的蛋白质含量及 SOD 活性最高,具有较强的抗寒性,这一结果与前人的研究结果相符;同时,该研究还发现,砧木 MD001 可溶性糖含量和 CAT 活性最高;砧木 GM310 的 POD

活性最高,表明这两个砧木材料也具有较强的抗寒性。由此可见,在参试 12 份材料中,山丁子、MD001 以及 GM310 的抗寒性较好。但植物的抗寒性是一个及其复杂的生理生化过程^[9],通过上述几个生理指标只对苹果砧木的抗寒性进行了初步比较,还有待于进一步验证。

参考文献:

- [1] 王小得. 浙皖地区桤木属(*Eurya*)植物抗逆性研究[D]. 南京:南京林业大学,2005:24-31.
- [2] 李彦慧,杜绍华,纪惠芳,等. 低温胁迫对大叶女贞膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J]. 北林果研究,2007(3):84-86.
- [3] 余文琴,刘星辉. 低温胁迫下芒果叶片若干生理生化变化[J]. 福建农业大学学报,2001,30(2):180-184.
- [4] 高志红,章镇,韩振海. 果梅种质枝条抗寒性鉴定[J]. 果树学报,2005,22(6):9-11.
- [5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:167-169.
- [6] Chen H H, Li P H. Biochemical changes in tuber-bearing *Solanum* species in relation to frost hardiness during cold acclimation[J]. *Plant Physiol*, 1980, 66: 414-421.
- [7] Yelenosky G, Guy C L. Carbohydrate accumulation in leaves and stems of 'Valencia' Orange at progressively colder temperature[J]. *Bot Gaz*, 1977, 138(1): 13-17.
- [8] 赵玲玲,宋来庆,刘志,等. 低温胁迫下 4 种苹果砧木叶片多糖的变化[J]. 果树学报,2008,25(2):151-156.
- [9] 倪志华,陈团显,朱博,等. 果树抗寒性研究进展[J]. 现代园艺,2009(8):11-13.

Effects of Low-temperature on the Physiological Indexes of Stock Leaf of Different Varieties of Apple

FENG Zhang-li¹, LIU Chang¹, ZHAO De-ying², LIU Yan-jie¹, GU Guang-jun¹, CHENG Xian-min¹, BU Hai-dong¹

(1. Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041; 2. Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100)

Abstract: To explore the cold resistance of different apple stocks, the physiological changes for 12 varieties of apple stocks at low temperature were analyzed comparatively. The results showed that the protein content, soluble starch content and SOD activity were the highest in Shandingzi, and the soluble sugar content and CAT activity of MD001 were the highest, GM310 had the highest POD activity, which indicated that Shandingzi, MD001 and GM310 had stronger cold resistance than the others among the 12 apple stocks. Further variance analysis showed that there were extremely significant differences of the SOD activity, POD activity, CAT activity, soluble sugar content and soluble protein content between 12 stocks ($P < 0.01$), which indicated that different cold resistance was among different stocks.

Key words: low temperature treatment; apple stock; leaf; physiological indexes