

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201311058

赖静, 杨伟, 龚荣高, 等. 低温胁迫下枇杷幼果种子膜脂过氧化、保护酶活性及显微结构的变化[J]. 广西植物, 2015, 35(5):663—667

Lai J, Yang W, Gong RG, et al. Changes in membrane lipid peroxidation, activities of cell defense enzyme and microstructure in the seed of loquat young fruit under chilling stress[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5):663—667

低温胁迫下枇杷幼果种子膜脂过氧化、 保护酶活性及显微结构的变化

赖静¹, 杨伟², 龚荣高^{1,2*}, 石佳佳¹, 郑云锋¹, 陈仲刚¹

(1. 四川农业大学园艺学院, 四川雅安 625014; 2. 龙泉驿区农村发展局, 四川龙泉 610000)

摘要: 枇杷(*Eriobotrya japonica*)开花结果正值冬季低温期,易受低温影响,因此寒害成为抑制枇杷健康生长、发育的重要因素之一。种子作为产生多种内源激素的中心,其健康程度与枇杷果实正常发育息息相关。该研究以四川省成都市龙泉驿区柏合镇的‘早钟六号’枇杷幼果种子为材料,经不同低温(6、3、0、-3℃)胁迫不同时间(12、24、36、48 h)后,对其相对电导率、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的变化进行测定以及细胞解剖结构分析,旨在探究枇杷幼果种子抗寒机制,为提高四川地区枇杷抗寒栽培新技术提供理论和实践依据。结果表明:低温胁迫下,枇杷幼果种子相对电导率及MDA含量随着处理温度的降低整体呈上升趋势;保护酶SOD、CAT活性在低温胁迫前期不同程度升高,至某个低温后呈下降趋势;而POD活性总体呈升—降—升趋势;相对电导率、MDA含量、SOD活性、CAT活性、POD活性的变化临界温度均为6℃,胁迫临界时间分别为12、24、48、36 h,而MDA含量变化临界温度为3℃,胁迫临界时间为36 h;显微结构表明枇杷幼果种子6℃低温开始受冻,最先受冻部位为种皮,其次为种胚真叶原始体或真叶,最后到细胞破裂,说明枇杷幼果种子随着处理温度降低,细胞结构受损越严重。综上,枇杷幼果种子受冻临界温度为6℃,受冻临界时间为12 h。

关键词: 种子; 低温胁迫; 膜脂过氧化; 保护酶; 显微结构

中图分类号: Q945.78, S667.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0663-05

Changes in membrane lipid peroxidation, activities of cell defense enzyme and microstructure in the seed of loquat young fruit under chilling stress

LAI Jing¹, YANG Wei², GONG Rong-Gao^{1,2,*}, SHI Jia-Jia¹,
ZHENG Yun-Feng¹, CHEN Zhong-Gang¹

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Rural Development Agency of Longquan, Longquan 610000, China)

Abstract: Loquat (*Eriobotrya japonica*) Rosaceae loquat (*Eriobotrya*), native to subtropical country, is widely popular, because of its high economic value and ornamental value. But loquat flowering period comes in the winter cold, vulnerable to low impact, so chilling injury to become one of the important factors inhibiting the loquat healthy and sustainable development. Seeds produce a variety of endogenous hormones as the center of their health degree and is closely related to the normal development of loquat fruit. The ‘Zaozhong’ loquat cultivar young fruits were selected

收稿日期: 2014-08-31 修回日期: 2014-12-26

基金项目: 国家农业科技成果转化项目(2010GB2F000408)

作者简介: 赖静(1989-),女,四川眉山人,硕士,研究方向为果树生理生态及栽培,(E-mail)236606766@qq.com。

*通讯作者: 龚荣高,博士,副教授,研究方向为果树生理生态及栽培,(E-mail)63830947@qq.com。

to study the cold resistance under different low temperatures (6, 3, 0, -3 °C) and different times (12, 24, 36, 48 h). The relative electric conductivity, MDA, SOD, CAT, POD and microstructure in seed of loquat young fruit were determined under different low temperature. The results showed that the relative electric conductivity and MDA of seed increased under low temperature; The protective activities of SOD and CAT in seed increased at moderate low temperature stress, then showed declining trend when the temperature attained certain critical temperature stress; The protective activities of POD had an up-down-up trend; The critical temperature of relative electric conductivity, SOD, CAT and POD was 6 °C, the critical times 12, 24, 48, 36 h. But the critical temperature of MDA was 3 °C, the critical time was 36 h. Microstructure diagram showed that the loquat seeds of young fruit was firstly destroyed 6 °C, the firstly destroyed part was testa, followed by the leaf primordium or leaf again to change the material composition and content of the cell, and finally to the cell rupture; The microstructure in seed of loquat young fruit was destroyed, comparing with CK, during low temperature. Therefore, the critical low temperature was 6 °C, the critical time was 12 h in seed. This study would provide a theoretical and practical significance to improve the basis for the new cultivation technologies of loquat in Sichuan region.

Key words: seed; chilling stress; peroxidation; activities of cell defense enzyme; microstructure

枇杷 (*Eriobotrya japonica*) 为蔷薇科枇杷属 (*Eriobotrya* Lindley) 植物, 原产于我国亚热带地区。果肉滑软多汁, 营养丰富, 具有较高的药用和园林价值。枇杷开花坐果正值冬季低温期, 因此寒害成为抑制枇杷健康生长、发育的重要因素之一。陈正洪 (1991) 对枇杷花果冻害的研究表明枇杷幼果最易受冻, 常表现为种子受冻致死。种子是产生多种内源激素的中心, 而激素是控制生长发育的关键物质, 因此种子除用于生长繁殖外, 对果实生长发育也极为重要 (刘丙花等, 2008; 侯元凯等, 2011)。枇杷幼果种子受冻将严重影响枇杷果实坐果率、大小、外观、发育进程、成熟期。而前人主要研究了低温胁迫对番茄 (杜晓东等, 2011)、紫花苜蓿 (崔国文, 2009)、西瓜 (苏玉环等, 2008) 等种子萌发的影响。

关于低温胁迫下枇杷种子抗寒机制的报道甚少。只有郑国华等 (2008a, b) 和张贺英 (2007) 对低温胁迫下枇杷幼果细胞超微结构及膜透性和保护酶活性的变化作了相关研究, 表明枇杷幼果在 6 °C、3 °C 低温下超显微结构及膜透性和保护酶活性无明显变化, 0 °C 开始受冻, -3 °C 低温下, 幼果受冻严重; 陈发河 (2008) 通过对枇杷果实冷害及其抗冷性诱导机理研究, 得出热处理能诱导合成一系列蛋白, 有效缓解冷害。而以幼果果肉为试材, 从生理和组织结构来研究枇杷幼果种子耐寒性的报道尚少。本研究以枇杷幼果种子为材料, 研究低温胁迫下其组织结构、膜脂过氧化及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 活性的变化, 为系统研究枇杷抗寒机制和抗寒栽培新技术提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

‘早钟六号’幼果种子, 取自四川省成都市龙泉驿区柏合镇工农村果园。选取长势一致无病虫害与机械损伤、生长正常的带幼果枝条, 果径为 1.5~2 cm, 采后 4 h 内抵达实验室, 将其培养在装有营养液的锥形瓶中, 营养液采用改良霍格兰配方, 进行梯度降温后, 分别置于 6、3、0、-3 °C 条件下处理 12、24、36、48 h, 以 15 °C 为对照。6、3、0 °C 处理置于人工气候箱 (相对湿度为 70%, 光照时间为 7:00—19:00, 光照强度为 3 000 lx)。-3 °C 处理置于改装冰柜, 其精确度为 ±1 °C, 用普通日光灯照射, 其相对湿度、光照时间和强度同人工气候箱处理相一致。对‘早钟六号’幼果种子在不同温度不同时间段进行相关生理指标测定。选取低温处理 48 h 枇杷幼果种子进行解剖结构研究。

1.2 方 法

参照李合生 (2000) 的方法, 用 DDS-307 型电导仪测其电导率; MDA 的测定采用硫代巴比妥酸法; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定用抑制光化还原法; 过氧化氢酶 (CAT) 活性测定用高锰酸钾滴定法; 过氧化物酶 (POD) 活性测定用愈创木酚法。显微结构的观察用经典石蜡切片法。

2 结 果 与 分 析

2.1 低温胁迫下枇杷幼果种子相对电导率的变化

相对电导率反映细胞膜透性的变化。图 1 显

示,枇杷幼果种子相对电导率随处理温度降低和时间延长整体呈上升趋势。低温处理 12 h,相对电导率前期变化缓慢,3 ℃低温之后迅速增加,而其余处理均在 6 ℃低温后迅速增加。-3 ℃处理 48 h,相对电导率达最大值(55.47%)。说明枇杷幼果种子于 6、3 ℃以下低温分别处理 24、12 h 以后,细胞膜透性开始出现变化,外渗物质增多,细胞膜在一定程度上遭受破坏。

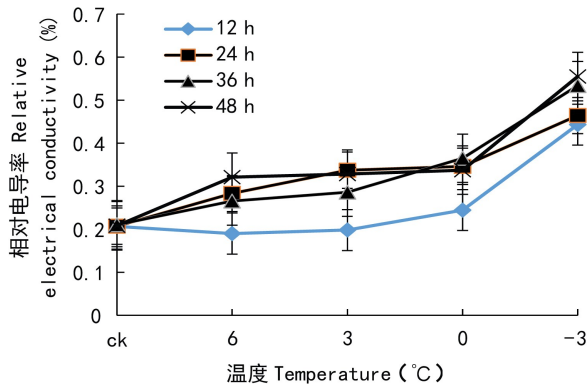


图 1 低温胁迫下枇杷幼果种子相对电导率的变化

Fig. 1 Changes of electrolyte leakage in seed of loquat young fruit under chilling stress

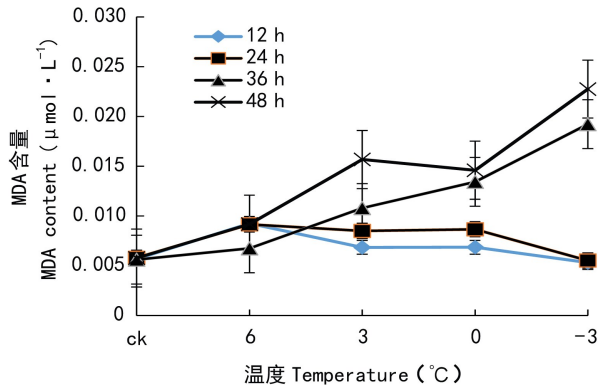


图 2 低温胁迫下枇杷幼果种子 MDA 含量的变化

Fig. 2 Changes of MDA in seed of loquat young fruit under chilling stress

2.2 低温胁迫下枇杷幼果种子 MDA 含量的变化

MDA 作为膜脂过氧化反应的终产物,是细胞膜受害的重要指标之一。由图 2 可知,枇杷幼果种子 MDA 含量在低温处理 12、24 h 以内变化幅度不大,随着处理时间延长而迅速增加,从 3 ℃低温开始显著高于对照。表明枇杷幼果种子膜脂过氧化反应 3 ℃低温处理 36 h 后逐渐增强。

2.3 低温胁迫下枇杷幼果种子 SOD 活性的变化

SOD 作为清除氧自由基的关键酶,对防止氧自由基对细胞膜的伤害起重要作用。图 3 显示,低温处理 12 h,枇杷幼果种子 SOD 活性呈上升趋势,其余处理其活性水平均呈先上升后下降趋势。低温处理 24、36 h,SOD 活性前期迅速上升,于 3 ℃达最大值,随后缓慢下降至低于对照;而低温处理 48 h,SOD 活性于 6 ℃达最高值,随后迅速下降至低于对照,表明 SOD 活性受到明显抑制。

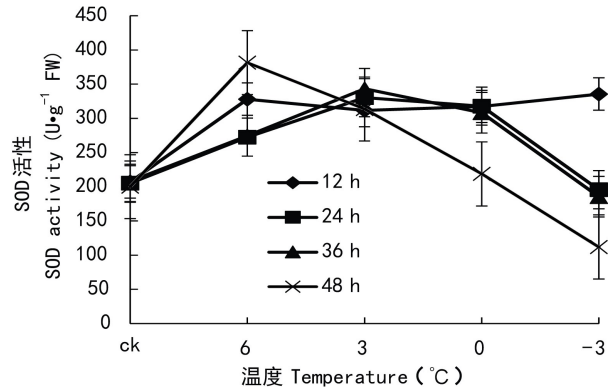


图 3 低温胁迫下枇杷幼果种子 SOD 活性的变化

Fig. 3 Changes of SOD in seed of loquat young fruit under chilling stress

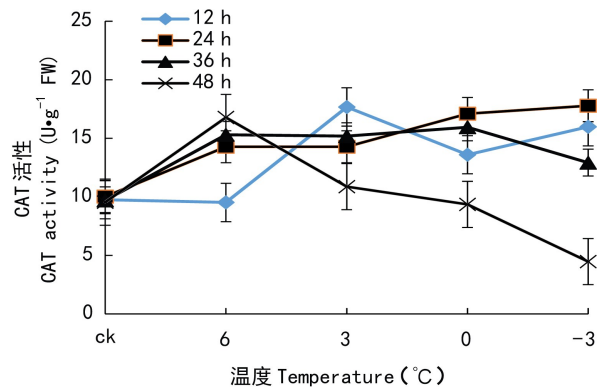
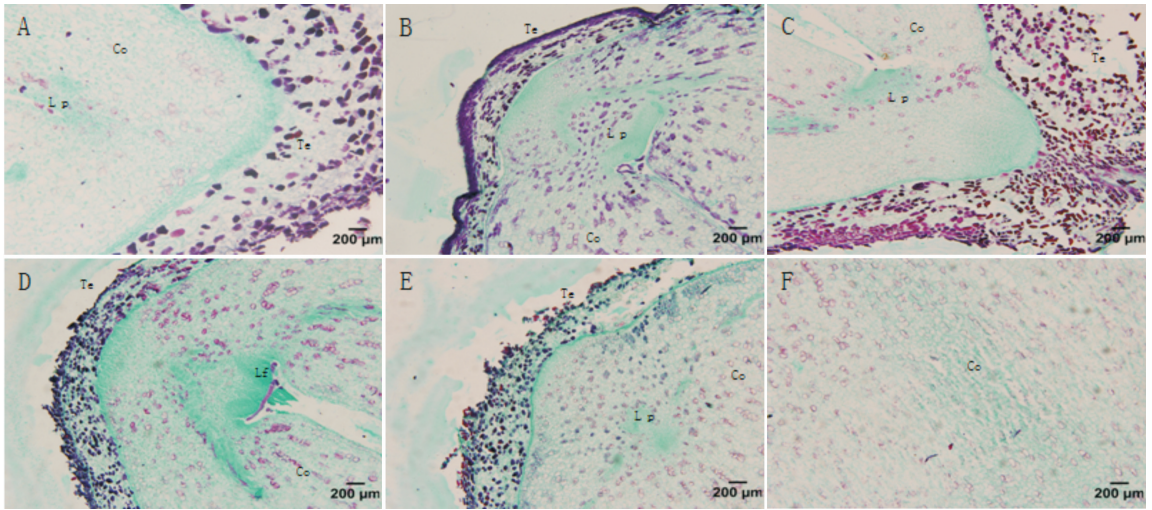


图 4 低温胁迫下枇杷幼果种子 CAT 活性的变化

Fig. 4 Changes of CAT in seed of loquat young fruit under chilling stress

2.4 低温胁迫下枇杷幼果种子 CAT 活性的变化

CAT 是控制植物体内 H_2O_2 水平的重要酶类。图 4 显示,低温处理 12、24 h,枇杷幼果种子 CAT 活性整体呈上升趋势,表明低温胁迫诱导了其活性上升。而低温处理 36、48 h,CAT 活性前期均剧烈上升,分别于 0、6 ℃低温以后下降,但在不同低温下,前者 CAT 活性均高于对照,而后者于 6 ℃低温



图版 I 低温胁迫下枇杷幼果种子石蜡切片显微结构 A. 对照组种子显微结构; B. 6 °C 低温下种子显微结构; C. 3 °C 低温下种子显微结构; D. 0 °C 低温下种子显微结构; E, F. -3 °C 低温下种子显微结构。Co: 子叶; Le: 真叶; Lp: 真叶原始体; Te: 种皮。

Plate I Microstructure for seed of loquat young fruit under chilling stress A. Microstructure of CK loquat; B. Microstructure of 6 °C loquat; C. Microstructure of 3 °C loquat; D. Microstructure of 0 °C loquat; E, F. Microstructure of -3 °C loquat. Co: Cotyledon; Le: Leaf; Lp: Leaf primordium; Te: Testa.

后降低于对照。表明 6 °C 低温处理 48 h 后, 枇杷幼果种子 CAT 活性受到明显抑制。

2.5 低温胁迫下枇杷幼果种子 POD 活性的变化

POD 在逆境中对细胞膜保护起重要作用。由图 5 可知, 不同处理下 POD 变化趋势为升—降—升, 但低温处理 12、24 h, POD 活性变化幅度低于其他处理, 整体呈上升趋势, 且低温处理 12 h, POD 活性明显高于处理 24 h。低温处理 36、48 h, POD 活性于 6 °C 前迅速上升, 随后急剧下降, 于 3 °C 达到低值后又迅速上升到明显高于对照。表明枇杷幼果种子 POD 活性低温胁迫 36 h 后出现明显紊乱。

2.6 低温胁迫下枇杷幼果种子显微结构的变化

图版 I: A 显示, 正常枇杷幼果种子由种皮和种胚组成, 种皮与种胚连接紧密、无分裂, 种皮细胞小而排列紧密, 多呈方形或长方形; 靠近种皮的种胚细胞小、排列紧密, 往深处体积逐步增大, 形状越来越不规则, 排列疏松; 种皮细胞被番红染成紫红色, 种胚真叶原始体处偶有几个细胞被番红染色, 颜色较浅。6 °C 低温下, 枇杷幼果种子的种皮与种胚轻微分离, 种皮被番红染色正常, 且种皮最外层有明显凹陷。种胚细胞被番红染色面积大且颜色呈紫红色, 真叶原始体处等均无破裂现象(图版 I: B)。3 °C 低温下, 枇杷幼果种子的种皮与种胚轻微分离, 两者连接处的蜡质层出现明显凹陷; 种皮有缺失, 经番红染色后显色正常; 真叶原始体处有破裂, 种胚中偶有几

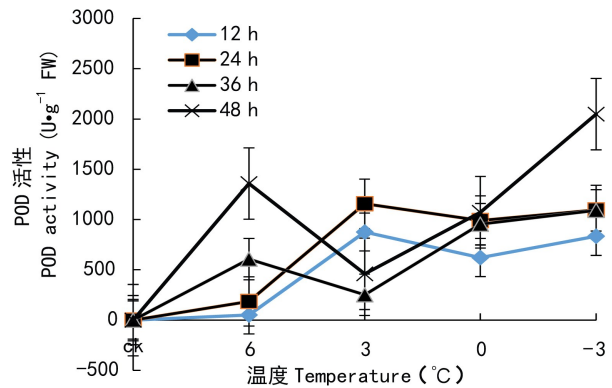


图 5 低温胁迫下枇杷幼果种子 POD 活性的变化

Fig. 5 Changes of POD in seed of loquat young fruit under chilling stress

个细胞被番红染色, 其染色深度和面积均小于 6 °C 低温处理, 可能是由于 3 °C 低温下种胚细胞中一些物质成分和含量发生了变化。0 °C 低温下, 枇杷幼果种子显微结构如图版 I: D 所示; 种皮与种胚紧密连接; 种皮被番红染色异常, 颜色较深呈紫褐色; 真叶原始体分化出真叶, 细胞破裂严重, 种胚细胞被番红染色程度和面积均大于 6 °C 低温处理。-3 °C 低温下, 枇杷幼果种子的种皮与种胚出现严重分离, 两者连接处的蜡质层出现明显凹陷; 种皮有缺失, 番红染色后显色异常, 颜色深至紫褐色; 种胚细胞被番红染色面积大、颜色深, 部分细胞被染成褐色, 局部出现明显皱缩、破裂现象(图版 I: E, F)。

以上显微结构的变化反映了不同低温下枇杷幼果种子的组织结构变化, 这为枇杷幼果抗寒性提供了直观证据。本研究表明, 枇杷幼果种子在 6 °C 低温下开始受冻, 随着温度越低, 受冻症状越严重, 这一结果同生理结果基本一致; 低温胁迫下, 枇杷幼果种子最先受冻部位为种皮, 其次为种胚真叶原始体或真叶, 最后到细胞破裂。-3 °C 低温下, 种胚子叶细胞皱缩、破裂, 发生不可逆的损伤, 表明枇杷幼果遭受严重冻害。

3 讨论

3.1 枇杷幼果种子抗寒性与膜脂过氧化和保护酶活性

本研究表明, 低温胁迫下 SOD、CAT 活性前期上升, 到一定胁迫程度后均受到抑制, 防御能力减弱, 这与前人(王华等, 2000; 杨盛昌等, 2003; 郑国华等, 2008)的研究结果相似。SOD 活性越高, 说明其转化超氧化物阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)能力越强, 效率越高。表明枇杷幼果种子通过自身生理调节, 转化多余自由基以适应低温; 0、-3 °C 低温持续 24 h 后, SOD 活性逐渐降低至低于对照, 表明在该低温胁迫下, 枇杷幼果种子 SOD 酶转化自由基($O_2^{\cdot-}$)能力减弱, SOD 酶活性降低。CAT 活性在低温持续 24 h 以内, 均高于对照, 表明低温诱导了其活性上升, 枇杷幼果种子 CAT 酶清除 SOD 酶转化而成 H_2O_2 能力增强, 从而彻底清除多余的活性氧; 6 °C 低温持续 48 h 后, CAT 活性受到明显抑制, 迅速降低, 表明该低温胁迫下枇杷幼果种子 CAT 酶遭受不可逆的破坏。SOD 酶、CAT 酶受损将造成活性氧的大量积累, 膜脂过氧化反应剧烈, MDA 含量增加, 从而引起生理代谢失调, 造成膜结构受损。枇杷幼果种子 POD 酶由无到有, 说明低温可诱导枇杷幼果种子 POD 酶的产生, 是对低温胁迫的保护性应激反应; 低温胁迫 36、48 h 时, POD 活性变化剧烈无常, 这同前人(杨春祥等, 2005; 杨盛昌等, 2003; 王华等, 2000)的研究结果不同, 可能是由于枇杷幼果种子受冻后, 相对电导率的升高, 细胞膜透性增强, 外渗物质增多, 影响 POD 活性测定或低温下产生的其他物质同 POD 酶活性变化有一定相关性。

3.2 枇杷幼果种子抗寒性与显微结构

显微结构表明, 枇杷幼果种子最先受冻部位为种皮, 其次为种胚真叶原始体或真叶, 再次到细胞内物质成分和含量变化, 最后到细胞破裂。种皮位于

种子最外层, 最早感受外界温度变化, 能对低温胁迫做出最快反应; 种胚真叶原始体或真叶遭受破坏, 说明低温抑制了种胚的生长发育, 间接影响果实; 同时, 种子细胞中一些细胞核、染色体、木质素和单宁等物质被番红染色成红色, 随着温度降低, 颜色基本呈逐渐加深趋势, 这可能是冷害加剧了细胞的木质化程度, 从而引起木质素大量积累。POD 为木质素合成最后一步的关键酶, 与木质素含量呈正相关(梁艳荣等, 2003; 田国忠等, 2001)。这与 POD 活性在低温胁迫严重情况下又再度上升的现象有一定相关性。-3 °C 低温下, 种胚子叶细胞破裂, 从解剖结构上证明了细胞膜受损。

参考文献:

- Chen FH(陈发河). 2008. Effect of the loquat fruit during cold-induced injury and cold resistance mechanism(枇杷果实冷害及其抗冷性诱导机理的研究)[D]. Xiamen(厦门): Jimei University(集美大学)
- Chen ZH(陈正洪). 1991. Research loquat frost damage (1) loquat fruit frost and freezing observational trials factor analysis(枇杷冻害的研究(D)枇杷花果冻害的观测试验及冻害因子分析)[J]. *Chin J Agromet*(中国农业气象), **12**(4): 16-20
- Cui GW(崔国文). 2009. Effect of low temperature stress on soluble sugar and starch of alfalfa at germination period(低温胁迫对紫花苜蓿种子萌发期可溶性糖和淀粉的影响)[J]. *J Northeast Agric Univ*(东北农业大学学报), **40**(1): 72-76
- Du YD(杜尧东), Duan SP(段世萍), Chen XG(陈新光), et al. 2010. Effect of low temperature on the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed(低温对番茄种子萌发的影响)[J]. *Chin J Agromet*(中国农业气象), **31**(4): 541-545
- Hou YK(侯元凯), Huang L(黄琳), Yang CW(杨超伟), et al. 2011. The correlation between seed characters and cone characters of *Xanthoceras sorbifol*(文冠果种子性状与果实性状的相关性研究)[J]. *J Cent S Univ For & Technol*(中南林业科技大学学报), **31**(9): 24-27
- Li HS(李合生), Shun Q(孙群), Zhao SJ(赵世杰). 2000. Plant Physiological and Biochemical Principles and Techniques(植物生理生化实验原理和技术)[M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社): 256-258
- Liang YR(梁艳荣), Hu XH(胡晓红), Zhang YL(张颖力), et al. 2003. Progress on physiological function research of plant Peroxidase(植物过氧化物酶生理功能研究进展)[J]. *J Inn Mongolia Agric Univ*(内蒙古农业大学学报), **24**(2): 111-113
- Liu BH(刘丙花), Jiang YM(姜远茂), Peng FT(彭福田), et al. 2008. Dynamic changes of endogenous hormone contents in the pulp and seeds of sweet cherry fruit during growth and development(甜樱桃红灯果实发育过程中果肉及种子内源激素含量变化动态)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), **25**(4): 593-596
- Su YH(苏玉环), Zhao JF(赵金锋), Zhang XF(张晓芳), et al. 2008. Effects of low temperature on seed germination and seedling growth of watermelon(低温对西瓜种子萌发及幼苗生长的影响)[J]. *Seed*(种子), **27**(7): 57-60

(下转第 678 页 Continue on page 678)