

## 花期低温胁迫对梨花器官生理指标的影响

张超<sup>1</sup>, 贾兵<sup>2</sup>, 衡伟<sup>2</sup>, 叶振风<sup>2</sup>, 朱立武<sup>2\*</sup>

(1. 安徽农业大学农业园, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

**摘要:** 为了研究花期低温处理对梨花器官抗寒相关生理指标的影响, 以抗寒性强、中、弱的‘花长把’、‘鸭梨’和‘砀山酥梨’为材料, 取初花期枝条分别在 $-2^{\circ}\text{C}$ 条件下处理0、2、4和8 h后, 采用分光光度计测定花朵中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)与抗坏血酸过氧化物酶(ASP)活性以及脯氨酸(Pro)和丙二醛(MDA)含量。结果表明, 低温处理0 h后抗寒能力强的品种‘花长把’花朵中SOD、CAT、POD和ASP活性相对较低, 而抗寒能力相对较弱的品种‘砀山酥梨’上述活性相对较高; 随着低温胁迫时间延长, 过氧化物酶类活性除呈现已经报道的“先升后降”、“先降后升”与“持续下降”3种不同的变化趋势外, ‘砀山酥梨’SOD、CAT和ASP活性还呈现出“先降后升又降”的S形曲线变化。低温处理0 h条件下, 抗寒力弱的‘砀山酥梨’花朵中脯氨酸含量最高, 抗寒力强的‘花长把’最低, ‘鸭梨’脯氨酸含量比‘花长把’略高。但在低温胁迫下, ‘花长把’脯氨酸含量迅速上升至较高水平, ‘砀山酥梨’脯氨酸水平变化不明显。低温处理0 h‘花长把’对MDA具有较大的耐受力, 低温胁迫时表现出很强的MDA清除能力; 而‘鸭梨’和‘砀山酥梨’对MDA耐受力较低, 低温胁迫时清除MDA能力也相对较差。该研究结果为梨树抗寒品种资源筛选及预防花期冻害提供了试验依据。

**关键词:** 梨树; 花朵; 低温胁迫; 生理指标; 酶活性

中图分类号: S661.201

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2016)04-0615-05

## Effect of cold stress on physiological characters of pear flower

ZHANG Chao<sup>1</sup>, JIA Bing<sup>2</sup>, HENG Wei<sup>2</sup>, YE Zhenfeng<sup>2</sup>, ZHU Liwu<sup>3</sup>

(1. Experimental Farm, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** In order to study the effect of cold stress ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) on physiological characters of the pear floral organ during the flowering time, cold resistant cultivar ‘Huachangba’ (*Pyrus ussuriensis* Maxim.), medium-resistant cultivar ‘Yali’ (*P. bretschneideri* Rehd.), and cold-sensitive cultivar ‘Dangshansuli’ (*P. bretschneideri*) pear plants were used as experimental materials. Flowering branches were taken in early blossom stage and treated at  $-2^{\circ}\text{C}$  in a freeze chamber for 0, 2, 4 or 8 h. Enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (ASP) and the contents of proline and malondialdehyde (MDA) in each flower sample were determined using spectrophotometer. The results showed that SOD, CAT, POD and ASP activities in the flower of the cold resistant ‘Huachangba’ pear were relatively low, whereas those in the cold-sensitive ‘Dangshansuli’ pear were relatively high after treated at  $-2^{\circ}\text{C}$  for 0 h. As the cold stress prolonged, the SOD, CAT and ASP activities in the flower of ‘Dangshansuli’ pear showed an S-shaped curve trend with a pattern of “drop at beginning then raise and drop”. The other three trends of “raise at beginning then drop”, “drop at beginning then raise” and “durative decline” of the peroxide enzymes, which were reported before been observed. Under the cold stress at  $-2^{\circ}\text{C}$  for 0 h, the proline content in the cold-sensitive ‘Dangshansuli’ pear flowers was the highest, followed by in the cold midium-resistant ‘Yali’ pear, and the cold resistant ‘Huachangba’ pear. Under the cold stress, the content of proline in flowers of the cold resistant ‘Huachangba’ pear increased rapidly to a higher level, whereas that in ‘Dangshansuli’ pear did not change obviously. ‘Huachangba’ pear had greater tolerance to higher MDA content

收稿日期: 2016-03-28

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-14)资助。

作者简介: 张超, 农艺师。E-mail: 1013204303@qq.com

\* 通信作者: 朱立武, 教授。E-mail: zhuliwu@ahau.edu.cn

under normal circumstances and strong ability of removing MDA under the cold stress, whereas 'Yali' and 'Dangshansuli' pears revealed low tolerance to MDA and poor ability of removing MDA under the cold stress. These results would provide an experimental basis for screening cold resistant cultivars and preventing pear flowers from frost damage.

**Key words:** pear plant; flower; cold stress; physiological characters; activity of peroxide enzymes

近年来,黄河故道地区梨树栽培生产中花期冻害时有发生,已经成为该区梨生产中首要的自然灾害。梨树遭受低温冻害后,轻者造成花器官损伤、引起落花落果、产量和品质降低,严重时甚至造成绝收。据砀山县果业协会调查,2015年,砀山县果园场、园艺场、葛集、良梨、唐寨、文庄等18个乡镇(场)的1500 km<sup>2</sup>酥梨,平均着果率只有正常年份的42%左右。据调查分析,在砀山酥梨开花期,-2℃的低温霜冻持续数小时,即可导致酥梨花朵的柱头、子房受冻,干枯失水,失去受粉受精功能,落花落果严重。目前,有关梨树花期冻害调查、气象因子分析及防御对策研究较多<sup>[1-5]</sup>,而关于梨树冻害与抗寒相关生理指标的研究报道相对较少<sup>[6-7]</sup>。

在正常生长发育过程中,植物细胞内活性氧的产生与清除处于动态平衡。当细胞受到逆境胁迫时,会产生一定量的超氧化物阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、羟自由基(OH·)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等,对细胞膜造成损伤。为保护自身免受活性氧的伤害,植物形成了细胞膜的酶保护系统,主要是超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)与抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, ASP)等。脯氨酸(proline)不仅是一种渗透调节物质,而且作为活性氧的清除剂稳定蛋白质、DNA和膜结构,降低凝固点防止细胞脱水,作为能量库调节细胞氧化还原势。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是膜脂过氧化的产物,其含量变化能够反映果树受低温伤害的程度。围绕着酶保护系统、脯氨酸(proline, Pro)和MDA含量研究,我国学者在柑桔、苹果、葡萄、杏树、核桃和无花果等树种上做了大量工作<sup>[5,8-9]</sup>。但是有关梨树不同抗寒力品种花期冻害细胞膜酶保护系统,尚缺乏较为全面的研究报道<sup>[7]</sup>。

本试验选择抗寒性较强的秋子梨(*Pyrus ussuriensis* Maxim.)品种‘花长把’、抗寒性中等的白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd.)品种‘鸭梨’和抗寒性较弱的白梨(*P. bretschneideri*)品种‘砀山酥梨’,研究梨树不同品种抗寒能力与相关酶活性及Pro和MDA含量的关系,为梨树抗寒品种资源筛选、预防花期冻害提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

‘花长把’、‘鸭梨’和‘砀山酥梨’,植株30年生,嫁接砧木为杜梨,取初花期(10%~20%)花朵的花瓣张开)枝条,材料取自中国农业科学院果树研究所(辽宁兴城)国家梨树种质资源圃。

### 1.2 方法

**1.2.1 低温处理** 将花枝插在具有1/2 MS营养液的烧杯中、置于-2℃低温冰柜进行0、2、4和8h的低温处理,每处理40朵花,重复3次。测定花朵中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT),过氧化物酶(POD),抗坏血酸过氧化物酶(ASP)活性以及脯氨酸(proline)和丙二醛(MDA)含量。

**1.2.2 相关酶活性的测定** 根据SOD抑制氯化硝基四氮唑蓝(TBA)在光下的还原作用来确定酶活性大小。具体测定方法参照文献[10]。

CAT可催化如下反应:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , 通过测定H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>减少量来测定CAT活性;POD能使愈创木酚氧化,生成茶褐色的4-邻甲氧基苯酚,可用分光光度计测定生成物的含量来测定POD活性<sup>[11]</sup>。

ASP催化抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应,使AsA氧化成为单脱氢抗坏血酸。随着AsA被氧化,溶液的A<sub>290</sub>值下降,根据单位时间内A<sub>290</sub>的减少量计算ASP活性<sup>[12]</sup>。

**1.2.3 脯氨酸和MDA含量的测定** 脯氨酸和茚三酮试剂呈显色反应,其含量与颜色深浅成正相关,可用分光光度计测定<sup>[12]</sup>。丙二醛在酸性和高温条件下,可以与硫代巴比妥酸(TBA)反应生成红色产物,在532 nm处有最大光吸收,在600 nm处有最小光吸收,据此测定MDA含量<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同梨品种花朵SOD活性变化

低温处理0h时,‘花长把’花朵中的SOD活性最低,‘鸭梨’居中,‘砀山酥梨’最高。在低温处理4h内,‘花长把’SOD活性迅速上升、4~8h缓慢下降。低温处理的2h内,‘鸭梨’和‘砀山酥梨’花朵中的SOD活性,迅速下降、2~4h内开始升高、4~8h又呈现下降趋势,但是‘砀山酥梨’下降的速度最快

(图 1)。

由此说明, 花朵中的 SOD 活性与梨树花期抗寒性具有较密切的关系。低温处理 0 h 后 SOD 活性越高的品种, 其抗寒能力相对较弱; 受到低温胁迫时, 抗寒能力强的品种 SOD 活性迅速上升, 而抗寒能力相对较弱的品种 SOD 活性却快速下降。

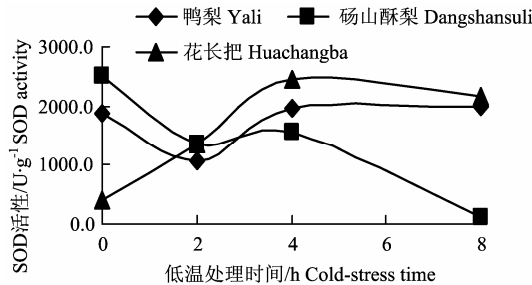


图 1 低温处理不同品种梨花朵 SOD 活性动态变化  
Figure 1 Dynamic changes of superoxide dismutase activity in the pear flower of different cultivars under low temperature condition

## 2.2 低温处理梨花朵中 CAT 活性比较

低温处理 0 h 条件下, ‘砀山酥梨’花朵中的 CAT 活性最高, ‘鸭梨’最低, ‘花长把’居中。低温处理 2 h 内, ‘砀山酥梨’的 CAT 活性迅速降低, ‘花长把’的 CAT 活性急剧增加, ‘鸭梨’的 CAT 活性上升缓慢。低温处理 2~4 h 时, ‘砀山酥梨’的 CAT 活性迅速升高, ‘花长把’的 CAT 活性明显下降, ‘鸭梨’的 CAT 活性继续缓慢升高。低温处理 4~8 h 时, ‘砀山酥梨’、‘花长把’和‘鸭梨’的 CAT 活性, 均呈现逐渐下降的趋势。但是, ‘砀山酥梨’的 CAT 活性始终维持在较高水平, 并且一直高于‘花长把’和‘鸭梨’ (图 2)。

因此可见, 在遭受低温胁迫时, 梨抗寒性较强的品种‘花长把’和‘鸭梨’花朵中 CAT 活性出现“先升后降”的趋势, 而抗寒性较强的品种‘砀山酥梨’, 花朵中 CAT 活性则呈现“S”形曲线变化。

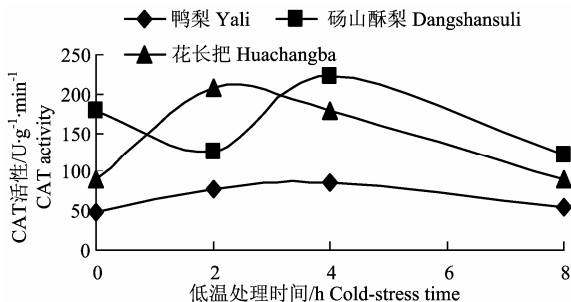


图 2 低温处理不同品种梨花朵 CAT 活性动态变化  
Figure 2 Dynamic changes of catalase activity in the pear flower of different cultivars under low temperature condition

## 2.3 低温处理对梨花朵中 POD 活性的影响

低温处理 0 h 条件下, ‘砀山酥梨’花朵中的 POD 活性较高, ‘花长把’和‘鸭梨’POD 活性相对较低。低温处理 2 h 内, 三者 POD 活性变化不明显。低温处理 2~4 h 时, ‘砀山酥梨’的 POD 活性升高迅速, ‘花长把’和‘鸭梨’的 CAT 活性略有上升。低温处理 4~8 h 时, 三者 POD 活性均有较小幅度下降 (图 3)。

低温胁迫条件下, 梨抗寒性较强的品种, 花朵中 POD 活性变化不明显, 而抗寒性较弱的品种, 则 POD 活性呈现较大幅度增加。

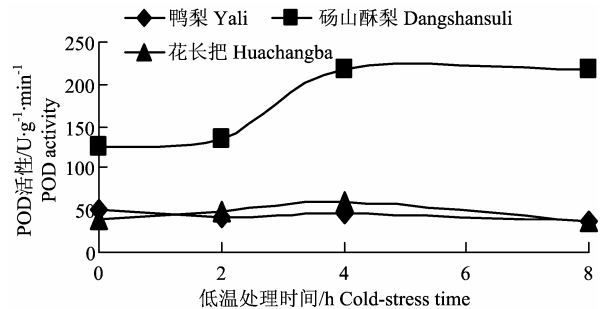


图 3 不同品种梨花朵 POD 活性动态变化  
Figure 3 Dynamic changes of peroxidase activity in the pear flower of different cultivars under low temperature condition

## 2.4 低温处理不同品种 ASP 活性比较

低温处理 0 h 条件下, ‘花长把’花朵中的 ASP 活性最弱, ‘砀山酥梨’和‘鸭梨’ASP 活性相对较强。低温处理 2 h 内, ‘砀山酥梨’和‘鸭梨’ASP 活性快速下降, ‘花长把’花朵中的 ASP 活性却呈现上升趋势。低温处理 2~4 h, ‘花长把’ASP 活性继续上升, ‘鸭梨’ASP 活性继续下降, 此时‘砀山酥梨’ASP 活性转而迅速升高, 并且超过了‘鸭梨’。低温处理 4 h~8 h, ‘砀山酥梨’和‘花长把’的 ASP 活性逐渐下降, 而‘鸭梨’ASP 活性又呈现上升趋势, 最终水平接近‘花长把’ (图 4)。

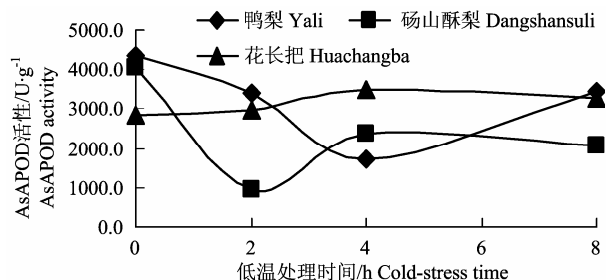


图 4 低温处理不同品种梨花朵 ASP 活性动态变化  
Figure 4 Dynamic changes of ascorbate peroxidase activity in the pear flower of different cultivars treated under low temperature

## 2.5 不同品种脯氨酸含量比较

低温处理 0 h 条件下, 抗寒力弱的‘砀山酥梨’花朵中脯氨酸含量最高, 抗寒力强的‘花长把’最低, ‘鸭梨’脯氨酸含量比‘花长把’略高。低温处理过程中, ‘砀山酥梨’花朵中脯氨酸始终处于较高水平、且变化不明显; ‘鸭梨’脯氨酸含量 0~4 h 内逐渐升高、4~8 h 内逐渐降低; ‘花长把’脯氨酸含量 0 h~2 h 内急剧上升、2~4 h 内迅速下降、4~8 h 内逐渐下降 (图 5)。

这一结果表明, 在正常环境下, 梨树抗寒能力强的品种花朵中脯氨酸含量比抗寒能力弱的品种少。但是, 在低温胁迫下, 其脯氨酸含量会迅速上升至较高水平, 以便对有机溶质进行渗透调节。

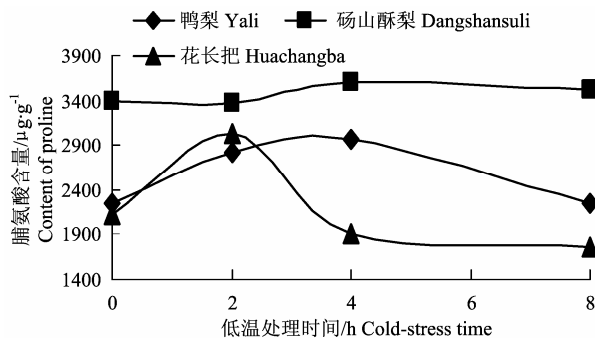


图 5 低温处理不同品种梨花朵 Pro 含量变化

Figure 5 Dynamic changes of proline content in the pear flower of different cultivars under low temperature condition

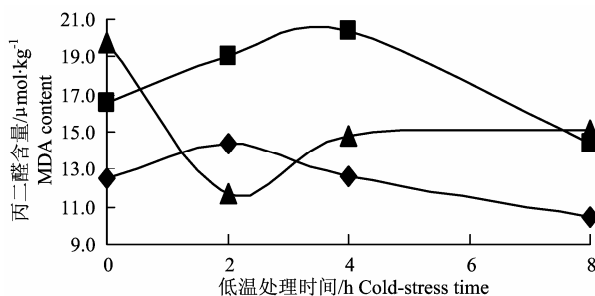


图 6 低温处理不同品种梨花朵 MDA 含量变化

Figure 6 Dynamic changes of malondialdehyde content in the pear flower of different cultivars under low temperature condition

## 2.6 不同处理丙二醛含量变化

低温处理 0 h, ‘花长把’花朵中 MDA 含量较高, ‘鸭梨’较低, ‘砀山酥梨’居中。低温处理 4 h 内, ‘砀山酥梨’花朵中 MDA 含量逐渐升高, 且始终处于较高水平; 4~8 h 内逐渐降低。低温处理 2 h 内, ‘鸭梨’MDA 含量缓慢升高; 2~8 h 内逐渐降低; ‘花长把’MDA 含量 0~2 h 内急剧下降、2~8 h 内缓慢上升

(图 6)。

说明‘花长把’低温处理 0 h 条件下具有较大的 MDA 耐受力, 低温胁迫时具有很强的 MDA 清除能力; 而‘鸭梨’和‘砀山酥梨’对 MDA 耐受力较低, 低温胁迫清除 MDA 能力也相对较差。

## 3 讨论

植物为减少低温造成的细胞膜伤害, 通常会改变保护酶活性以降低膜脂过氧化作用。对‘寒富’苹果的研究认为, 花芽中 SOD、POD 活性越高, 其耐寒力越强<sup>[9]</sup>; 而对苹果砧木 SH12、CG80、M26 和 JM7 枝条中 SOD 的研究并未得出相同结论<sup>[15]</sup>。本试验结果发现, 抗寒性强的‘花长把’正常条件下花朵中 SOD、CAT、POD 和 ASP 活性, 均显著低于抗寒性相对较弱的‘砀山酥梨’。由此可见, 植物耐寒性强弱与保护酶活性高低的的关系, 因植物种类、组织器官不同, 而呈现不同结果<sup>[14-16]</sup>。

从保护酶活性变化趋势看, 随着抗寒锻炼的逐步深入, 保护酶活性下降, 抗寒性强的品种下降幅度小, 且与抗寒性呈显著相关<sup>[17-19]</sup>。然而, 尽管 SOD、CAT、POD 和 ASP 可清除自由基, 减轻膜脂过氧化对细胞的伤害, 但这种保护作用有限。当胁迫压力超过植物所能承受的极限时, 逆境条件会破坏酶的活性中心, 通过改变酶的结构或抑制酶的表达, 使得酶活性下降。逆境胁迫下, 植物中过氧化酶类活性主要有 3 种不同的变化趋势, 一是“先升后降”; 二是“先降后升”; 三是“持续下降”<sup>[20-22]</sup>。根据本研究结果, 在梨树低温胁迫时, 上述三种变化趋势均有出现; 此外, 随着低温处理时间的延长, ‘砀山酥梨’花朵中 SOD、CAT 和 ASP 活性还呈现出“先降后升又降”的 S 形曲线变化。

植物体内脯氨酸是一种理想的有机溶质渗透调节物。一般认为, 与相同种类抗逆能力弱的植物比较, 正常环境下抗逆能力强的植物脯氨酸含量高; 逆境胁迫条件下, 其脯氨酸含量上升也更快<sup>[23-25]</sup>。然而, ‘库尔勒香梨’枝条低温冻害研究结果, 并不能支持这一变化规律<sup>[26]</sup>。本试验结果, 正常状态下‘花长把’花朵内脯氨酸含量很低, 但在逆境条件下则迅速积累, 其积累的速度与数量, 反映了梨树花朵低温胁迫下的渗透调节能力。

MDA 是膜脂过氧化作用的分解产物, 其含量可以反应植物受逆境伤害的程度。本试验研究发现, 低温处理 0 h 时‘花长把’具有较高的 MDA 水平, 低温胁迫时 MDA 水平迅速降低, 表明‘花长把’具有很强的 MDA 清除能力。同时, 说明低温处理 0 h 后

梨花花朵的 MDA 含量, 并不能反映梨不同品种花期的抗寒能力。

### 参考文献:

- [1] 贾春霞, 张小珍, 马春晖. 梨园春季晚霜冻害发生与预防技术[J]. 北方园艺, 2013(11): 197-20.
- [2] 杨红雁, 冀爱青. 祁县酥梨花期冻害分析及防御对策[J]. 山西果树, 2012(3): 37-38.
- [3] 杨谦俊, 吕波, 张现伟. 酥梨花期冻害的预防及气象因子分析[J]. 河南气象, 2006(4): 54-55.
- [4] 巴特尔·巴克, 克热木·伊力, 匡玉疆. 库尔勒香梨历年冬季低温评价及严重冻害成因分析[J]. 新疆农业大学学报, 2008, 31(4): 17-20.
- [5] 王菲, 尹燕雷, 冯立娟, 等. 果树抗寒性研究进展[J]. 山东农业科学, 2014, 46(9): 141-145.
- [6] 曲柏宏, 李玉梅. 延边地区梨品种抗寒性研究[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(5): 615-618.
- [7] 龙春跃, 克热木·伊力, 买合木提·卡热, 等. 库尔勒香梨枝条、花芽冻害发生程度与相关生理指标研究[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(2): 6~10.
- [8] 周书娟, 王飞, 田治国, 等. 新疆‘树上干’杏耐寒株系的鉴定与筛选[J]. 园艺学报, 2011, 38(10): 1976-1982.
- [9] 成文博, 赵德英, 刘国成. 寒富苹果腋花芽抗寒机理研究[J]. 中国果树, 2010(3): 14-17.
- [10] 陈建勋, 王晓峰. 植物学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2008.
- [11] 张治安, 陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2008.
- [12] 乔富廉. 植物生理学实验分析测定技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.
- [13] 赵世杰, 史国安, 董新纯. 植物生理学实验指南[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.
- [14] 姚立新, 朱锐, 马雯彦, 等. 植物抗旱、抗寒性鉴定与生理生化机理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 11864-11866.
- [15] 梅立新, 蒋宝, 赵政阳, 等. 几种方法测定苹果矮化砧木枝条抗寒性指标的比较[J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 103-106.
- [16] 田景花, 王红霞, 高仪, 等. 核桃属 4 树种展叶期抗寒性鉴定[J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2439-2446.
- [17] RENAUT J, HANSMAN J F, BASSETT C, et al. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L.) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2008, 4(4): 589-600.
- [18] 吕庆芳, 李映志, 余伟. 持续低温引起菠萝蜜田间寒害症状调查及抗寒性分析[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 81-85.
- [19] TAKAHASHI D, LI B, NAKAYAMA T, et al. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4(article 90): 1-4.
- [20] 李英丽, 果秀敏, 张建光, 等. 高温胁迫对苹果果皮组织抗氧化特性的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(1): 18-20.
- [21] 吴建慧, 赵军, 孙国荣. 高温对玉米幼苗膜脂过氧化作用的影响 [J]. 哈尔滨师范大学(自然科学学报), 2007, 21(1): 82-85.
- [22] 江萍, 王小平, 王雪莲, 等. 高温胁迫对文冠果保护酶系统酶活性的影响研究[J]. 北方园艺, 2008(1): 28-32.
- [23] 邱勇泼, 罗凤霞, 白瑞琴, 等. 热胁迫下矮牵牛幼苗的形态和生理变化[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(1): 88-92.
- [24] 邵岭, 刘光玲, 李芸瑛, 等. 高温下花红苋和绿叶苋叶片生理特性变化的比较[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(4): 378-382.
- [25] 吴固胜, 曹婉虹, 王永建, 等. 细胞膜稳定性及保护酶和大白菜耐热性的关系[J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 353-358.
- [26] 林彩霞, 吴运建, 鲁晓燕, 等. 不同冻害程度对香梨生理指标的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(10): 121-125.