

马铃薯幼苗在冷驯化期间的生理生化变化

李飞^{1,2}, 刘杰¹, 段绍光¹, 金黎平^{1*}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 贵州省马铃薯研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要:以霜冻敏感的中薯3号和耐冻的野生马铃薯03079-435 (*Solanum acaule*)的幼苗为试材, 对其总叶绿素含量、丙二醛(MDA)含量、脯氨酸含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量的变化进行测定。结果表明: 冷驯化期间(4℃/2℃, 昼/夜), 两者的总叶绿素含量都呈先降后升的变化趋势; 03079-435叶片的脯氨酸含量先升高后降低, 总体呈升高趋势, 而中薯3号叶片的脯氨酸含量逐渐降低; 两个基因型的可溶性糖和可溶性蛋白含量均有所升高, 中薯3号叶片的可溶性蛋白含量增加幅度明显低于03079-435。推断幼苗叶片脯氨酸和可溶性蛋白含量的增加与冷驯化能力的增强密切相关。

关键词:马铃薯幼苗; 冷驯化; 生理生化变化

环境温度是植物生长、存活的主要决定因素之一, 许多植物经一定时间非伤害性温度下锻炼后能获得在致死温度下生存的能力。植物获得耐寒性的适应过程称为冷驯化^[1]。这个过程涉及大量诸如呼吸作用、光合作用、糖代谢和氧化还原调节等一系列在基因表达水平上受到调控的代谢变化^[2]。马铃薯是喜冷凉作物, 生长的最适温度范围在16~20℃^[3], 普通栽培种通过冷驯化后耐冻性并不能提高, LT_{50} 仍然保持不变, 而有些野生马铃薯种通过冷驯化后耐冻性却能明显提高。目前关于马铃薯植株在冷驯化期间生理生化机理研究还少见报道, 为此本试验以霜冻敏感的普通栽培品种中薯3号和耐冻的野生马铃薯03079-435 (*Solanum acaule*)为材料, 就冷驯化期间马铃薯幼苗体内发生的生理生化变化和耐冻性的关系进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2007年10月14日在中国农业科学院蔬菜花

卉研究所南口温室内将耐冻且能冷驯化的野生材料03079-435和霜冻敏感的中薯3号播种于10cm×10cm的营养钵内, 每份材料播种45株, 栽培基质为1:1的泥炭土和蛭石。出苗生长4周后转入NK人工气候箱内, 气候箱条件为4℃/2℃白天/晚上, 14h光照, 光照强度 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 在低温处理0、1、3、5、7d后取样, 每次取幼苗成熟的完全叶片用于生理生化指标检测, 每个指标每次检测为3次重复。

1.2 试验方法

总叶绿素含量的测定和脯氨酸含量的测定参照张治安等^[4]方法, MDA含量的测定采用硫代巴比妥酸法, 可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法测定, 可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法G-250方法测定。数据统计分析采用DPS v7.05软件, 作图采用Excel 2007进行。

2 结果与分析

2.1 幼苗叶片总叶绿素含量的变化

冷驯化期间03079-435和中薯3号幼苗叶片总叶绿素含量变化趋势基本相同, 两者都是先降低, 后升高最后再降低(表1)。03079-435的总叶绿素含量在冷驯化的7d之间无显著差异, 表明白天4℃、晚上2℃的低温对03079-435的总叶绿素合成

收稿日期: 2008-07-21

基金项目: 国家科技支撑计划农业领域课题(2006BAD01A06)。

作者简介: 李飞(1977-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为马铃薯遗传育种。

* 通讯作者: E-mail: jinlp@mail.caas.net.cn。

没有明显影响。中薯 3 号在冷驯化 3d 与 0d 的总叶绿素含量相比呈显著差异, 从 1.832 mg·g⁻¹ 降到 1.448 mg·g⁻¹, 然后在 5 d 后又升高到 1.916 mg·g⁻¹, 7 d 冷驯化后降到 1.490 mg·g⁻¹, 表明霜冻敏感的中薯 3 号在冷驯化期间总叶绿素含量波动较大。

表 1 冷驯化期间总叶绿素含量的显著性测验

材 料	总叶绿素	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
	含量(mg·g ⁻¹)	1.528	1.476	1.332	1.486	1.448
03079-435	5%水平	a	a	a	a	a
	1%水平	A	A	A	A	A
	含量(mg·g ⁻¹)	1.832	1.674	1.448	1.916	1.490
中薯 3 号	5%水平	ab	abc	c	a	Bc
	1%水平	A	A	A	A	A

注: 采用 LSD 多重比较法; 小写字母表示 0.05 显著, 大写字母表示差异 0.01 极显著, 下同。

2.2 幼苗叶片丙二醛(MDA)含量的变化

两个试验材料在冷驯化期间 MDA 的含量变化趋势非常相似, 幼苗叶片 MDA 含量从第 3 d 后急剧上升, 5 d 后达到最高, 与其它天相比均呈极显著差异(表 2), 到 7 d 后每 g 又都分别降至 2.316 mmol 和 1.490 mmol。两者的最大区别是 MDA 含量的不同, 中薯 3 号的 MDA 整体含量都高于野生种 03079-435, 表明膜损伤程度大于 03079-435。

表 2 冷驯化期间丙二醛含量的显著性测验

材 料	丙二醛	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
	含量(mmol·g ⁻¹)	3.357	2.569	3.036	37.369	2.316
03079-435	5%水平	b	b	b	a	b
	1%水平	B	B	B	A	B
	含量(mmol·g ⁻¹)	1.832	1.674	1.448	1.916	1.490
中薯 3 号	5%水平	b	b	b	a	b
	1%水平	B	B	B	A	B

2.3 幼苗叶片脯氨酸含量的变化

由表 3 可知, 03079-435 叶片中的脯氨酸含量高于中薯 3 号。在冷驯化期间, 03079-435 叶片中的脯氨酸含量表现为先升后降而后趋向平稳, 而中薯 3 号的脯氨酸含量呈逐渐下降的动态变化。冷驯化 1 d 后, 03079-435 的脯氨酸含量急剧上升, 与 0 d 相比呈极显著差异, 随着驯化时间的延

长又逐渐回落, 比驯化前增加 47.92%; 而霜冻敏感的中薯 3 号在整个冷驯化期间脯氨酸含量一直呈下降趋势, 在后期又略有升高, 最后的脯氨酸含量比驯化前降低了 24.4%, 整个驯化期间无显著差异。

表 3 冷驯化期间脯氨酸含量的显著性测验

材 料	脯氨酸	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
	含量(μg·g ⁻¹)	59.555	135.230	75.481	91.105	88.095
03079-435	5%水平	b	a	b	b	b
	1%水平	B	B	B	AB	AB
	含量(μg·g ⁻¹)	1.832	1.674	1.448	1.916	1.490
中薯 3 号	5%水平	a	a	a	a	a
	1%水平	A	A	A	A	A

2.4 幼苗叶片可溶性糖含量的变化

由表 4 可见, 耐冻材料 03079-435 的可溶性糖含量呈逐渐增加趋势。03079-435 在冷驯化 1 d 后可溶性糖含量增幅远远高于中薯 3 号, 之后一直呈上升趋势, 即通过冷驯化后 03079-435 幼苗体内的可溶性糖含量急剧增加, 03079-435 在驯化期间 1 d、3 d、5 d、7 d 的可溶性糖含量分别与 0 d 呈极显著性差异, 7 d 与 1 d 呈极显著差异。霜冻敏感的中薯 3 号先升高后略为降低, 再急剧上升最后趋于平稳。在 5 d 和 7 d 的可溶性糖含量分别与 0 d 相比呈极显著差异。7 d 冷驯化后 03079-435 和中薯 3 号的可溶性糖含量分别是 0 d 的 4.2 倍和 3.1 倍, 冷驯化提高了马铃薯叶片的可溶性糖含量。

表 4 冷驯化期间可溶性糖含量的显著性测验

材 料	脯氨酸	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
	含量(%)	0.337	0.881	1.050	1.262	1.425
03079-435	5%水平	d	c	bc	ab	a
	1%水平	C	B	AB	AB	A
	含量(%)	0.389	0.512	0.444	1.204	1.187
中薯 3 号	5%水平	b	b	b	a	a
	1%水平	B	B	B	A	A

2.5 幼苗叶片可溶性蛋白含量的变化

在冷驯化期间 03079-435 和中薯 3 号叶片的可溶性蛋白含量表现出不同的变化趋势, 如表 5 所示。03079-435 在驯化期间叶片的可溶性蛋白一直呈上升趋势, 冷驯化的 3 d、5 d 和 7 d 与 0 d 和 1 d

达到极显著差异。霜冻敏感的中薯3号叶片可溶性蛋白含量在冷驯化1 d后上升, 后期并没有明显变化, 最后通过7 d的冷驯化后可溶性蛋白含量达 $8.407 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与冷驯化前的含量呈显著差异。03079-435和中薯3号通过7 d的冷驯化, 叶片可溶性蛋白含量分别比0 d增加了67.33%和14.27%, 由此可见冷驯化后野生马铃薯材料03079-435叶片的可溶性蛋白含量明显高于普通栽培品种中薯3号。

表5 冷驯化期间可溶性蛋白含量的显著性测验

材 料	可溶性蛋白	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
	含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	10.496	10.520	12.324	14.027	17.563
03079-435	5%水平	d	d	c	b	a
	1%水平	D	D	C	B	A
	含量(%)	7.357	7.783	8.129	8.163	1.187
中薯3号	5%水平	a	a	a	a	a
	1%水平	A	A	A	A	A

3 讨 论

3.1 冷驯化对总叶绿素含量的影响

一般来说, 总叶绿素形成的最低温度是 $2 \sim 4^\circ\text{C}$, 最适温度是 30°C 左右, 最高温度是 40°C ^[5]。本试验在 $4^\circ\text{C}/2^\circ\text{C}$ 白天/晚上的驯化条件下, 耐冻性强的03079-435只受到轻微的影响, 冷驯化后的总叶绿素含量仅比冷驯化前低5.26%, 而霜冻敏感的中薯3号总叶绿素波动较大, 最后的总叶绿素含量比驯化前低18.66%, 曾昭西等^[6]认为, 总叶绿素含量的降低可能是在低温胁迫条件下过氧化物酶参与了总叶绿素的降解, 导致总叶绿素含量下降。

3.2 冷驯化对MDA含量的影响

植物器官衰老或在逆境下遭受伤害, 往往发生膜质过氧化作用, 丙二醛(MDA)是膜质过氧化的最终分解产物, 其主要作用是破坏植物细胞膜系统。在7 d的冷驯化期间, 03079-435和中薯3号的丙二醛含量发生了较为相似的变化, 说明两者体内都受到伤害, 但中薯3号的丙二醛含量一直比03079-435高, 表明不耐冻的中薯3号受到伤害更严重。

3.3 冷驯化对脯氨酸含量的影响

游离脯氨酸具有作为一种重要的渗透调节物质,

在植物受低温胁迫时, 其含量增加有助于细胞或组织保水, 同时还可作为碳水化合物的来源, 酶和细胞结构的保护剂^[5]。冷驯化1 d后耐冻性强的03079-435体内的脯氨酸含量急剧升高, 然后快速下降, 后期趋于缓和。中薯3号的脯氨酸含量一直呈下降趋势, 最终03079-435的脯氨酸含量是中薯3号的3.84倍。王韶唐^[7]认为, 脯氨酸在积累之后又有下降趋势, 是由于胁迫条件下脯氨酸的生物合成来源于谷氨酸, 脯氨酸的不断更新需要碳水化合物的供应, 曹仪植^[8]认为, 当植物处于一定时期的低温胁迫之后, 由于碳水化合物供应受阻, 将会影响谷氨酸的形成, 进而影响脯氨酸的合成。Swaaij等^[9]研究认为, 马铃薯植株脯氨酸含量和耐冻性之间具有高度相关性, 耐冻性越强的在低温胁迫下脯氨酸含量越高。

3.4 冷驯化对可溶性糖含量的影响

叶片中可溶性糖含量的增加对提高细胞液浓度、增强细胞液的流动性和维持细胞膜在低温下的正常功能等方面有重要作用^[10]。在冷驯化期间, 03079-435和中薯3号的可溶性糖含量都明显增加, 分别为冷驯化前的4.2倍和3.1倍。说明通过冷驯化可使两者的可溶性糖含量都增加, 但不能确定可溶性糖是否与耐冻性诱导有关。据Chen等^[11]报道, 没有证据表明总糖含量和耐冻性有直接关系, 马铃薯可溶性糖的积累只是植株对于低温反应一个普通现象。

3.5 冷驯化对马铃薯可溶性蛋白含量的影响

研究发现在很多植物中可溶性蛋白含量的增加与耐冻性的提高紧密相关^[12-14], 可溶性蛋白含量与耐冻性是平行增加的^[12, 15]。可溶性蛋白的亲水性强, 能明显增强细胞的持水力, 可溶性蛋白质的增加可以束缚更多的水分, 同时可以减少原生质因结冰伤害而致死的机会。03079-435冷驯化后可溶性蛋白含量比冷驯化前增加了67.33%, 在冷驯化前后的半致死温度分别为 -5.3°C 和 -8.9°C , 说明在冷驯化过程中蛋白的新陈代谢对于耐冻性的提高具有重要作用, 可能是马铃薯耐冻性提高的关键因子。

[参 考 文 献]

- [1] Levitt J. Responses of plants to environmental stress. Chilling, freezing, and high temperature stresses [M]. New York: Academic Press,

- 1980: 497.
- [2] Graham D, Patterson B D. Response of plants to low, nonfreezing temperatures: protein, metabolism and acclimation[J]. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol*, 1982, 33: 347–372.
- [3] 门福义, 刘梦芸. 马铃薯栽培生理[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [4] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [5] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [6] 曾昭西, 王以柔, 刘鸿先. 低温光照下与黄瓜子叶总叶绿素降低有关的酶促反应[J]. *植物生理学报*, 1991, 17(2): 177–182.
- [7] 王韶唐. 植物抗旱的生理机理[M]//北京植物生理学会. 植物生理生化进展. 北京: 科学出版社, 1983.
- [8] 曹仪植, 吕忠恕. 水分胁迫下植物体内游离脯氨酸的累积及 ABA 在其中的作用[J]. *植物生理学报*, 1985, 11(1): 6–9.
- [9] Swaaij A C, Jakobsen E, Feenstra W J. Effect of cold hardening, wilt- ing and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum* [J]. *Physiol Plant*, 1985, 64:230–236.
- [10] 王伟娟. 低温锻炼提高沙冬青抗寒性的生理生化基础[D]. 北京: 林业大学, 2006.
- [11] Chen T, 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.
- [12] Kacperska P A. Mechanism of cold acclimation in herbaceous plants [M]// Li P H, Sakai A. *Plant cold hardiness and freezing stress*. New York: Academic Press, 1978: 139–152.
- [13] Levir J. Responses of plants to environmental stress [M]. New York: Academic Press, 1972: 697.
- [14] Smith D. Varietal chemical differences associated with freezing resistance in forage plants [J]. *Cryobiology*, 1969(5): 148–159.
- [15] Brown G N. Protein synthesis mechanisms relative to cold hardiness [M]//Li P H, Sakai A. *Plant cold hardiness and freezing stress*. New York: Academic Press, 1978: 153–163.

Physic-biochemical Changes Related to the Freezing Tolerance during Cold Acclimation in Potato Seedlings

Li Fei^{1,2}, Liu Jie¹, Duan Shaoguang¹, Jin Liping¹

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China;

2. Guizhou Potato Research Institute, Guiyang, Guizhou 550006, China)

Abstract: The chlorophyll content, MDA content, proline content, the soluble sugar content, and the soluble protein content were determined in the freezing sensitive variety Zhongshu 3 (*Solanum tuberosum*) and freezing tolerant clone 03079–435 (*S. acaule*) in order to understand the effects of cold acclimation on physio-biochemical changes in potato. The chlorophyll contents of both 03079–435 and Zhongshu 3 decreased during the period of cold acclimation (day/night temperature 4°C/2°C). The proline content of 03079–435 increased first and then decreased but more than that before cold acclimation, while the proline content of Zhongshu 3 was decreasing. The content of soluble sugar of the two genotypes increased, however the content of soluble sugar of 03079–435 was more than that of Zhongshu 3 during cold acclimation. These data suggest that increases in proline and soluble protein content be closely associated to the high cold acclimation in potato.

Key Words: potato seedling; cold acclimation; physic-biochemical changes

