

# 缺钼对黄瓜幼苗耐冷性的影响及其与抗氧化系统的关系

蔡欢 朱帅 宁宇 吴帼秀 艾希珍\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点开放实验室, 山东泰安 271018)

**摘要:** 为了探讨缺钼对黄瓜幼苗耐冷性的影响机理, 以津优3号黄瓜幼苗为试材, 设置缺钼(-Mo)和施钼(CK)2个处理, 在光照培养箱内进行低温(昼/夜温度为8℃/5℃)处理, 研究缺钼(-Mo)对黄瓜幼苗冷害指数、MDA含量、抗氧化酶活性及渗透调节物质含量的影响。结果表明, 低温下-Mo处理黄瓜幼苗叶片的电解质渗漏率(EL)、冷害指数和丙二醛(MDA)含量均显著高于CK, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性及谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量显著低于CK, 脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白质和游离氨基酸含量也低于CK。可见, 缺钼加重了低温对细胞膜的伤害, 降低了黄瓜幼苗的耐冷性; 抗氧化能力和渗透调节能力下降是缺钼引起黄瓜幼苗耐冷性减弱的重要原因。

**关键词:** 黄瓜; 低温; 缺钼; 膜脂过氧化; 渗透调节

钼是植物生长必须的重要微量元素(邹邦基和何雪晖, 1985), 它主要通过组成钼酶或辅助因子催化氧化还原反应, 调控植物的碳、氮等生理代谢过程。当前我国土壤中缺钼现象严重, 据统计, 可耕地土壤中缺钼面积达4460万 $\text{hm}^2$ , 占全国耕地面积的80%左右(张纪利等, 2009)。前人研究发现, 缺钼可引起冬小麦低温期黄化死苗现象, 导致其减产严重, 而施用钼肥则能促进冬小麦壮苗、壮蘖, 增强抗寒力, 并提高产量(Yaneva et al., 1996; 孙学成等, 2006)。缺钼还可引起烟草体内的硝酸盐积累, 氨基酸和蛋白质含量减少, 叶绿素合成受阻, 叶绿体结构破坏, 光合速率降低(李章海等, 2008)。然而, 其相关机理尚未见系统报道, 深入研究缺钼影响植物的生理代谢机理, 对合理施

用钼肥, 减轻逆境障碍和提高作物产量具有重要意义。黄瓜属于冷敏感植物, 在北方冬春季日光温室生产中经常遭遇低温胁迫, 严重影响产量和品质。因此, 如何缓解或克服低温逆境障碍成为近年来黄瓜抗逆生理研究的重要内容。植物的耐冷性与活性氧代谢关系密切, 低温下光合能力减弱, 会引起光能过剩, 从而产生大量的活性氧, 导致膜脂过氧化, 进而造成膜系统损伤(Dat et al., 2000)。本试验以津优3号黄瓜为试材, 研究缺钼对低温下黄瓜幼苗抗氧化系统和渗透调节的影响, 旨在揭示钼影响植物耐冷性的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种为津优3号。

### 1.2 试验设计

试验于2012年在山东农业大学园艺试验站进行。10月12日播种, 日光温室内用10 cm × 10 cm营养钵育苗, 育苗基质为沙子, 用去离子水浇灌。育苗环境为: 光量子通量密度(PFD)日均值约600  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 昼/夜温度均值约为26

蔡欢, 女, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜栽培生理, E-mail: 57222007@163.com

\*通讯作者(Corresponding author): 艾希珍, 女, 博士, 教授, 专业方向: 蔬菜栽培生理与分子生物学, E-mail: axz@sdau.edu.cn

收稿日期: 2014-04-09; 接受日期: 2014-11-17

基金项目: 山东省农业重大应用技术创新课题, “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD12B03)

℃/18℃。幼苗子叶展平时(10月19日)移入长28 cm、宽25 cm、高13 cm的塑料盆中,每盆5株。采用日本山崎黄瓜专用营养液配方进行培养,7 d更换1次营养液,每隔2 h用气泵通气1 h。

试验设施钼(对照,CK)和缺钼(-Mo)2个处理,CK用去离子水配制全营养液,全营养液含 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$  和  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 微量元素为全浓度,电导率 $2.2 \sim 2.5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pH 6.8~7.0; -Mo处理营养液中不加钼。幼苗长至三叶一心时(11月10日)移至光照培养箱中进行低温处理,处理条件为昼/夜温度 $8 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ }^\circ\text{C}$ , PFD  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光周期昼/夜为12 h/12 h。每个光照培养箱内放置 -Mo处理和对照(CK)各1盆,为保证温光条件一致,每天交换1次位置。在低温处理0、1、3、5、7 d后测定各项指标。

### 1.3 测定方法

用美国产ORIONTDS型电导率仪测定电导率,参照赵世杰和李德全(1999)的方法计算电解质渗漏率(EL),  $EL = (E_1 - E_0) / (E_2 - E_0)$ , 式中 $E_0$ 为去离子水电导率, $E_1$ 为杀死前电导率, $E_2$ 为杀死后电导率。参照于贤昌等(1998)的方法测定冷害指数。

采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定丙二醛(MDA)含量;采用氮蓝四唑(NBT)还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,以抑制光化还原50%为1个酶活性单位;采用愈创木酚法测定过氧化物酶(POD)活性(李合生等,2000);参照Chance和Maehly(1995)的方法测定过氧化氢酶(CAT)活性;采用比色法(Nakano & Asada, 1981)测定抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性,以1 min内290 nm吸光度的变化值表示酶活性。

参照Wang等(2004)的方法测定谷胱甘肽(GSH)与抗坏血酸(AsA)含量。采用磺基水杨酸法测定脯氨酸含量,用蒽酮比色法测定可溶性糖含量,用考马斯亮蓝G-250法测定可溶性蛋白质含量,用茚三酮法测定游离氨基酸含量(李合生等,2000)。

### 1.4 数据处理

数据均取3次重复的平均值,用Microsoft Excel软件处理数据和作图,用DPS软件对数据进

行单因素方差分析,并运用Duncan检验法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗电解质渗漏率和冷害指数的影响

表1表明,胁迫1 d时,CK的EL比胁迫前增加了6.1个百分点,而-Mo处理的增加了11.5个百分点。随着低温胁迫时间的延长,-Mo处理和CK的EL均持续升高,-Mo处理的始终高于CK。低温胁迫结束(7 d)时,-Mo处理的EL比CK高9.3个百分点,差异显著。

从表1可以看出,低温胁迫1 d时,黄瓜幼苗即出现冷害症状,-Mo处理的冷害指数显著高于CK。随着胁迫时间的延长,-Mo处理和CK的冷害指数均逐渐升高,但前者的上升幅度显著高于后者。可见,缺钼会加重低温对黄瓜幼苗的伤害。

表1 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗电解质渗漏率和冷害指数的影响

胁迫天数/d	电解质渗漏率/%		冷害指数	
	-Mo	CK	-Mo	CK
0	37.07	37.73	—	—
1	48.53	43.84	0.09*	0.02
3	53.68*	48.29	0.57*	0.21
5	59.96	58.36	0.85*	0.74
7	69.98*	60.66	0.98*	0.91

注: \*表示与对照(CK)差异显著( $\alpha=0.05$ )。

### 2.2 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗MDA含量及抗氧化系统的影响

2.2.1 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗MDA含量的影响 图1显示,低温胁迫1 d时,黄瓜幼苗叶片的

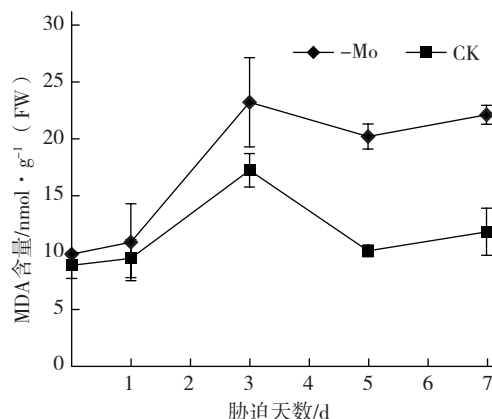


图1 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗MDA含量的影响

MDA 含量与胁迫前相比变化不大, 然而胁迫 1 d 后 MDA 含量快速增加, -Mo 处理的增幅显著大于 CK; 3 d 后 MDA 含量呈降低趋势, 但 -Mo 处理的仍显著高于 CK。胁迫时间继续延长, 各处理黄瓜幼苗叶片的 MDA 含量又趋于回升。胁迫结束时, -Mo 处理的 MDA 含量比 CK 高 86.1%。可见, 缺钼加重了低温引起的膜脂过氧化程度, 细胞膜受伤严重。

2.2.2 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗抗氧化酶活性的影响

影响 图 2 表明, 低温胁迫下各处理黄瓜幼苗叶片的 SOD 活性先逐渐升高, 5 d 后降低, -Mo 处理的 SOD 活性始终显著低于 CK。低温胁迫前 3 d, 各处理的 POD 活性明显升高, 3 d 后开始下降, 胁迫结束 (7 d) 时, -Mo 处理的 POD 活性较 CK 低 32.7%。胁迫期内各处理的 CAT 和 APX 活性变化趋势与 POD 相似, 即胁迫初期逐渐升高, 3 d 后快速下降, -Mo 处理的 CAT 和 APX 活性明显低于 CK。

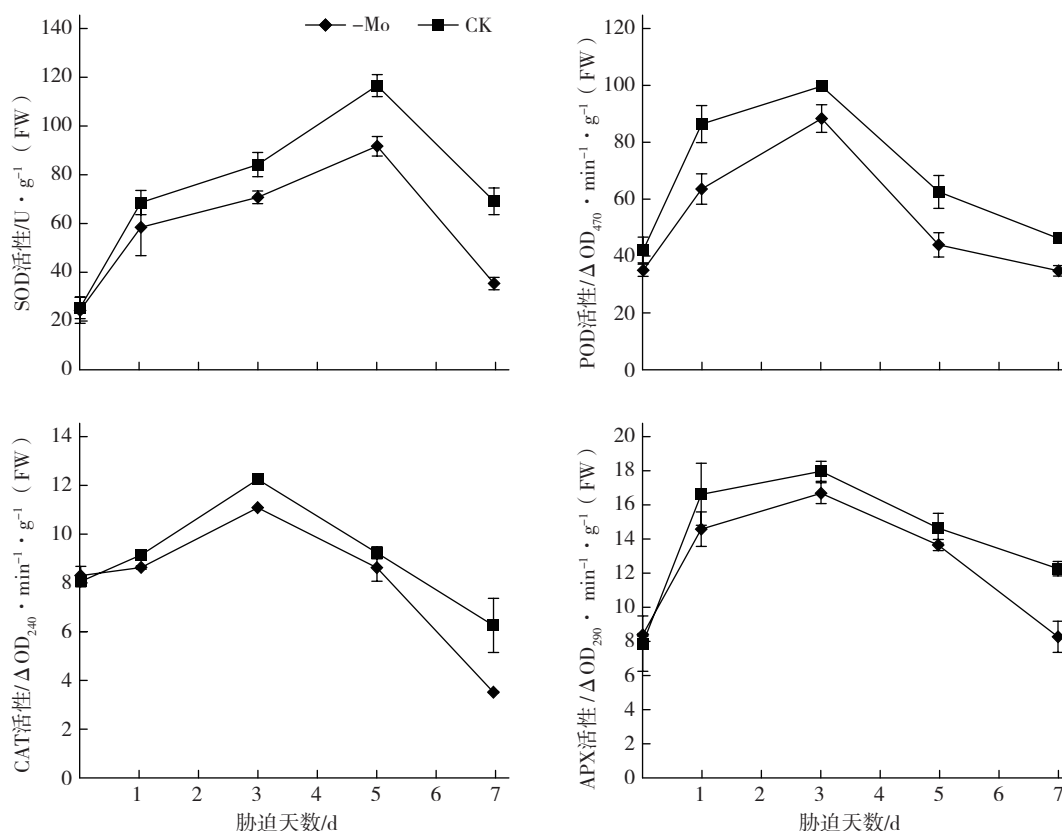


图 2 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗 SOD、POD、CAT 和 APX 活性的影响

2.2.3 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗 GSH 与 AsA 含量的影响

从图 3 可以看出, 低温胁迫 1 d 时, -Mo 处理的黄瓜幼苗谷胱甘肽 (GSH) 含量与 CK 差异不显著; 胁迫 1 d 后, 两者均有升高, 但 -Mo 处理的 GSH 含量增加幅度显著小于 CK; 胁迫时间延长至 5 d 后, 两处理的 GSH 含量同步下降; 胁迫结束 (7 d) 时, -Mo 处理的 GSH 含量比 CK 低 20.9%。低温胁迫 1 d 时, 各处理的抗坏血酸 (AsA) 含量均呈增加趋势, 但 -Mo 处理的 AsA 含量增加幅度显著小于 CK, 低温胁迫 1 d 后各处理的 AsA 含量均快速下降。胁迫结束时, -Mo 处理的 AsA 含量比

CK 低 47.9%。可见, 缺钼降低了黄瓜幼苗的活性氧清除能力, 这可能是缺钼加剧了低温引起的膜脂过氧化伤害的重要生理机制。

2.3 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗渗透调节物质含量的影响

从图 4 可以看出, 低温胁迫前, -Mo 处理的黄瓜幼苗脯氨酸含量与 CK 差异不显著; 低温胁迫后 1~3 d 两个处理的脯氨酸含量均呈增加趋势, 但 -Mo 处理的增加幅度显著小于 CK。胁迫 3 d 时, -Mo 处理的脯氨酸含量比 CK 低 34.5%。胁迫时间超过 5 d 后, 脯氨酸含量趋于平稳, 二者差异不显著。低温胁迫 1 d 后, 可溶性糖含量也呈增加

趋势, 但  $-Mo$  处理的增加幅度显著小于 CK; 3 d 后各处理黄瓜幼苗的可溶性糖含量开始下降, 胁迫结束时,  $-Mo$  处理的可溶性糖含量显著低于 CK。可见, 缺钼可使低温下黄瓜幼苗叶片的渗透调节能力减弱, 从而抑制幼苗的吸水能力, 加重低温胁迫对细胞膜的伤害。

低温胁迫前,  $-Mo$  处理的黄瓜幼苗可溶性蛋白质含量与 CK 差异不显著 (图 4), 低温胁迫后各处理的蛋白质含量均快速增加, 但  $-Mo$  处理的

增加幅度显著小于 CK。胁迫 3 d 后  $-Mo$  处理的可溶性蛋白质含量趋于平稳, 而 CK 的可溶性蛋白质含量快速降低, 二者差异明显减小, 胁迫 5 d 后同步下降。随着低温胁迫时间的延长, 黄瓜幼苗叶片的游离氨基酸含量呈先升高后降低趋势, 胁迫 1 d 时  $-Mo$  处理的游离氨基酸含量与 CK 差异不显著, 但胁迫 3 d 后  $-Mo$  处理显著低于 CK。胁迫 7 d 时  $-Mo$  处理的游离氨基酸含量较 CK 低 17.0%。

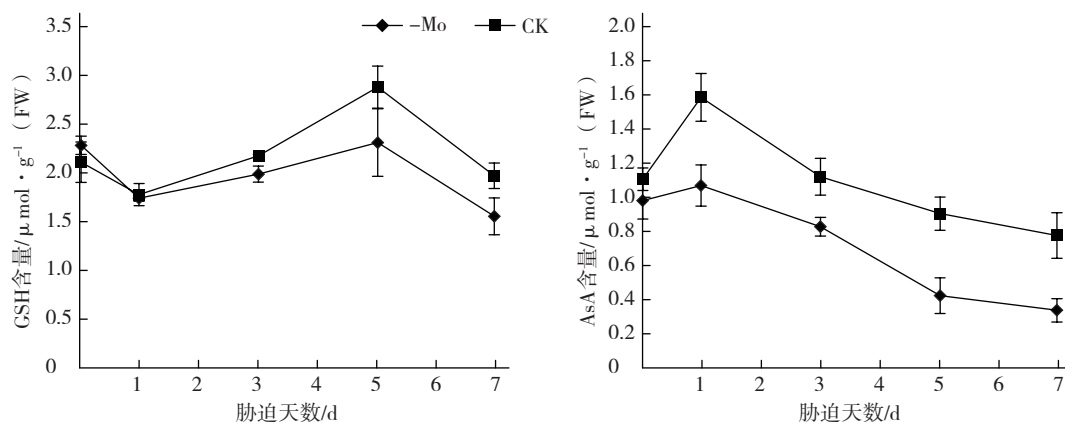


图 3 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗 GSH 和 AsA 含量的影响

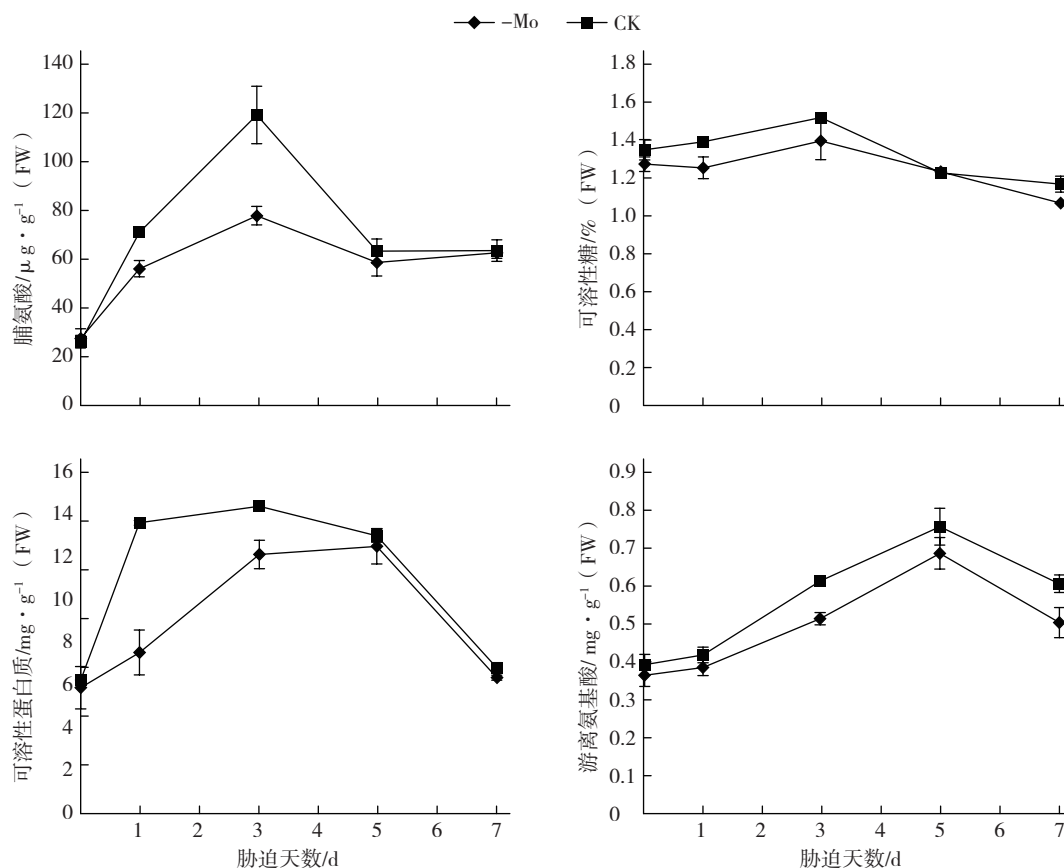


图 4 缺钼对低温胁迫下黄瓜幼苗脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的影响

### 3 结论与讨论

本试验结果表明,低温胁迫下黄瓜幼苗叶片的EL和MDA含量明显增加,说明黄瓜体内的自由基和活性氧大量积累,诱发膜脂过氧化,从而使细胞膜透性增加,导致电解质外渗(刘伟等,2009),但低温胁迫3d后MDA含量快速降低,这可能是植物经受低温胁迫过程中产生的自我调节和适应性反应。低温胁迫时间延长至5d时,黄瓜幼苗的MDA含量又趋于回升,说明此时低温对细胞膜的伤害已超出黄瓜自身的调节和适应能力,导致其冷害指数大幅度升高。与CK相比,低温下-Mo处理的EL和MDA含量显著升高,冷害指数明显增大,说明缺钼会降低黄瓜幼苗的耐冷性,对膜系统的伤害程度增强是黄瓜耐冷性下降的重要原因。

抗氧化系统是植物主要的防御系统,而SOD、POD、APX等被认为是清除活性氧过程中最主要的抗氧化酶类(罗娅等,2007)。本试验结果显示,低温下黄瓜幼苗叶片的SOD、CAT、POD、APX活性先逐渐升高,3~5d后快速降低。说明胁迫初期抗氧化酶活性的提高是植物对低温的一种应激或防御性反应,通过调节抗氧化酶活性去适应逆境并再次建立活性氧产生与清除的平衡关系(王洪涛等,2010),有利于植株在经受更低温度或更长时间的低温胁迫时维持较高的耐冷性(Baek & Skinner, 2003; Kuk et al., 2003)。然而,随着胁迫时间的延长,抗氧化酶活性降低,防御系统遭到破坏,因此,膜脂过氧化程度加重。-Mo处理的SOD、CAT、POD、APX活性始终低于CK,说明缺钼导致黄瓜幼苗活性氧代谢紊乱,加速自由基和活性氧的产生和积累。因为在光合电子传递过程中,电子直接传递给硝酸根,低温下当钼供应不足时,硝酸同化途径受阻,迫使大量电子通过NADP<sup>+</sup>进入三羧酸循环,反馈抑制这一途径的正常进行,使电子大量积累,进一步形成氧自由基等一系列活性氧,对植物细胞膜产生伤害(李文学等,2001),这是缺钼导致黄瓜幼苗耐冷性下降的重要机制。

低温胁迫初期,黄瓜幼苗叶片的脯氨酸和可溶性糖含量都明显升高。这是因为低温胁迫往往引起细胞膜透性增大,为了防止电解质过多外渗,植株会主动积累渗透调节物质,提高细胞液的渗透压,

增强细胞的吸水、保水能力。与CK相比,-Mo处理的脯氨酸与可溶性糖含量在低温胁迫初期的增加幅度明显减小,表明-Mo处理可使黄瓜幼苗的渗透调节能力减弱,原因尚待进一步研究。前人研究表明,在多种逆境(干旱、盐分、低温等)胁迫下,植物体内正常的蛋白质合成常会受到抑制,但是往往有一些新的蛋白质被诱导或原有蛋白质含量明显增加(李妮亚等,1997;董绪兵等,2011)。正常条件下,植物体内的游离氨基酸含量很低,而低温胁迫可使其含量迅速上升。陶雅等(2010)研究发现,随着气温逐渐下降,苜蓿根部的氨基酸含量显著升高,并在冬季维持较高水平。王松华和周阮宝(1998)认为,水稻幼苗受到冷害后,氨基酸合成蛋白质的过程受阻,而蛋白质的分解加强,从而导致游离氨基酸含量升高。游离氨基酸的存在,可增加细胞液的浓度,提高渗透势,对细胞具有保护作用。此外,游离氨基酸具有很强的亲和性,对原生质的保水能力及胶体稳定性发挥积极作用。本试验中,低温下黄瓜幼苗可溶性蛋白质和游离氨基酸含量均呈先升高后降低趋势,说明低温胁迫初期黄瓜幼苗可通过增加蛋白质和游离氨基酸含量增强其低温耐性。钼与植物体内的氮代谢密切相关,它不仅影响植株全氮含量,而且影响硝态氮的转化、蛋白质的合成和氮在不同器官中的分配。本试验中低温胁迫下-Mo处理黄瓜幼苗叶片的蛋白质和游离氨基酸含量均低于CK,证实了缺钼影响硝酸还原,氮代谢能力下降,-Mo处理黄瓜幼苗耐冷性降低与蛋白质和游离氨基酸含量减少具有一定的相关性。

#### 参考文献

- 董绪兵,刘业霞,毕焕改,于军辉,艾希珍. 2011. 黄瓜幼苗干旱-低温交叉适应与渗透调节的关系. 中国农业科学, 4(2): 335-340.
- 李合生,孙群,赵世杰. 2000. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社.
- 李妮亚,曹翠玲,高俊凤. 1997. 干旱对小麦幼苗诱导蛋白表达与某些生理特性的初步探讨. 西北植物学报, 17(2): 210-216.
- 李文学,王震宇,张福锁,韩晓日. 2001. 低温对缺钼冬小麦幼苗生长的影响 II 对氮代谢的影响. 植物营养与肥料学报, 7(1): 88-92.
- 李章海,宋泽民,黄刚,杨梅林,周慧玲. 2008. 缺钼烟田施钼对烟草光合作用和氮代谢及烟草品质的影响. 烟草科技, (11): 56-58.

- 刘伟, 艾希珍, 梁文娟, 王洪涛, 刘升学, 郑楠. 2009. 低温弱光下水杨酸对黄瓜幼苗光合作用及抗氧化酶活性的影响. 应用生态学报, 20(2): 441-445.
- 罗娅, 汤浩茹, 张勇. 2007. 低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响. 园艺学报, 34(6): 1405-1410.
- 孙学成, 谭启玲, 胡承孝, 甘巧巧, 易长城. 2006. 低温胁迫下钼对冬小麦抗氧化酶活性的影响. 中国农业科学, 39(5): 952-959.
- 陶雅, 孙启忠, 玉柱. 2010. 游离氨基酸在苜蓿抗寒生理中的作用. 北京: 第三届中国苜蓿发展大会.
- 王洪涛, 艾希珍, 郑楠, 姜飞, 李清明. 2010. 嫁接对低温弱光下辣椒幼苗膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响. 应用生态学报, 21(5): 1289-1291.
- 王松华, 周阮宝. 1998. 三叶期前水稻幼苗抗寒生理研究. 安徽农业技术师范学院学报, 12(3): 15-18.
- 于贤昌, 邢禹贤, 马红, 魏珉. 1998. 不同砧木与接穗对黄瓜嫁接苗抗冷性的影响. 中国农业科学, 31(2): 36-40.
- 张纪利, 杨梅林, 罗红香, 陆新莉, 黄义德, 李章海. 2009. 土壤钼素营养状况及钼在烟草上的应用研究进展. 贵州农业科学, 37(4): 96-100.
- 赵世杰, 李德全. 1999. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社.
- 邹邦基, 何雪晖. 1985. 植物的营养. 北京: 农业出版社.
- Baek K H, Skinner D Z. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. Plant Science, 165(6): 1221-1227.
- Chance B, Maehly A C. 1995. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology, 2: 764-775.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranov A' E. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, 57(5): 779-795.
- Kuk Y I, Shin J S, Burgos N R. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. Crop Science, 43(6): 2109-2117.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22(5): 867-880.
- Wang L J, Huang W D, Li J Y, Liu Y F, Shi Y L. 2004. Peroxidation of membrane lipid and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. Plant Science, 167: 71-77.
- Yaneva I, Mack G, Vunkova-Radeva R. 1996. Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. Journal of Plant Physiology, 149(1): 211-216.

## Effects of Molybdenum Deficiency on Cold Resistance and Its Relationship with Antioxidant System in Cucumber Seedlings

CAI Huan, ZHU Shuai, NING Yu, WU Guo-xiu, AI Xi-zhen\*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Innovation of Agriculture Ministry, Tai'an 271018, Shandong, China)

**Abstract:** In order to investigate the mechanism of molybdenum deficiency on chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings, this paper takes 'Jinyou No.3' cucumber seedlings as test material, and sets up 2 treatments: molybdenum deficiency (-Mo) and molybdenum application (CK). The low temperature treatment (day/night temperature of 8 °C /5 °C) was carried out in light growth chamber. The effects of molybdenum deficiency on chilling injury index, MDA content, antioxidant enzyme activities, and osmoregulation substances of cucumber seedlings were studied. The results showed that under low temperature -Mo treatment, the electrolyte leakage (EL), chilling injury index, and MDA content of cucumber seedlings were all significantly higher than that of the CK; while the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), and contents of glutathione (GSH), and ascorbic acid (AsA) in cucumber seedlings were significantly lower than that of the CK. The contents of proline, soluble sugar, soluble protein and free amino acids were all lower than that of the control. These results suggest that molybdenum deficiency aggravates chilling damage to the membrane, and reduces the cold resistance of cucumber seedlings. The reduction in antioxidant abilities and osmotic self-regulation of -Mo treatment are the important reasons for cold tolerance weakening of cucumber seedlings.

**Key words:** Cucumber; Low temperature; Molybdenum deficiency; Membrane lipid peroxidation; Osmoregulation