



美容杜鹃叶片再生及愈伤组织耐热生理研究

罗琳,白洁,陈超,陈霞连,陈可,陈放*

(四川大学 生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室,成都 610064)

摘要:以美容杜鹃幼叶为外植体,通过三因素三水平的正交试验,探究不同培养基、激素对愈伤组织诱导、分化和植株再生的影响,并对愈伤组织进行38℃热胁迫,探讨热胁迫下其耐热生理指标随时间的变化规律。结果表明:(1)愈伤组织诱导和芽分化最佳培养基均为Read+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L TDZ;最佳壮苗培养基为改良MS+0.1 mg/L KT+0.2 mg/L NAA;最佳生根培养基为1/2改良MS+2.0 mg/L GA₃。(2)随着热胁迫时间的延长,愈伤组织中的可溶性糖和游离脯氨酸含量变化不明显,而MDA和可溶性蛋白质的含量呈上升趋势,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性则表现为先升后降趋势;其中,MDA含量、可溶性蛋白质含量、SOD和POD活性随时间变化显著,可作为评价美容杜鹃耐热性的生理指标。

关键词:美容杜鹃;叶片;愈伤组织;再生体系;耐热生理

中图分类号:Q813.1; Q945.78 文献标志码:A

Study on Plantlet Regeneration for Blade Segments and the Physiological Trait for Heat Tolerance in the Callus of *Rhododendron calophytum*

LUO Lin, BAI Jie, CHEN Chao, CHEN Xialian, CHEN Ke, CHEN Fang*

(College of Life Science, Sichuan University, Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment, Ministry of Education, Chengdu 610064, China)

Abstract: The blade segments of *Rhododendron calophytum* were used as explants for the studying of callus induction and plantlets regeneration by orthogonal experimental design. Callus were kept at 38℃ for exploring physiological changes over time. The result revealed that: (1) Read+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L TDZ was the best medium for its callus induction and differentiation of adventitious bud, the improved MS+0.1 mg/L KT+0.2 mg/L NAA was the better plantlet strengthening medium, and the 1/2 improved MS+2.0 mg/L GA₃ was the optimum medium for rooting. (2) The contents of proline and soluble sugar in callus changed inconspicuously. MDA and solution protein contents were increased, and activities of SOD and POD were first increased and then decreased, which can be considered as the evaluation of heat-resistance system for *R. calophytum*.

Key words: *Rhododendron calophytum*; blades; callus; regeneration system; physiological trait for heat tolerance

美容杜鹃(*Rhododendron calophytum*)为杜鹃花科杜鹃属多年生小乔木,中国特有树种,是著名的高

山观赏花卉^[1]。美容杜鹃中含有多种黄酮类^[2]和挥发油类活性成分,具有很高的经济和药用价值,是重

收稿日期:2014-03-06;修改稿收到日期:2014-05-29

基金项目:四川省科技厅应用基础项目(2012JY0090);四川省科技基础条件平台项目—四川大学植物标本数字化平台建设及共享(2012JCP004)

作者简介:罗琳(1989—),女,在读硕士研究生,主要从事现代生物技术研究。E-mail:644348375@qq.com

*通信作者:陈放,博士,教授,主要从事植物学研究。E-mail:baijie@scu.edu.cn

要的资源植物。美容杜鹃野外引种工作复杂艰巨,因其种子极小,萌发时对土壤和环境要求苛刻^[3],扦插苗生长缓慢存活率低,且对高温的忍耐力不强,而低海拔地区夏季持续的高温和干燥空气极易导致美容杜鹃死亡,因此,繁殖难度和高温胁迫问题限制了以美容杜鹃为代表的高山杜鹃资源的开发和利用。

罗彭等^[4]对美容杜鹃的茎段进行了快繁体系研究,但是茎段脱分化较难,且增殖系数较低,因此本研究以美容杜鹃叶片作为外植体,利用组培快繁技术^[5-7],建立再生优化体系,为进一步研究和繁殖美容杜鹃奠定基础。此外,通过对美容杜鹃愈伤组织热胁迫下生理指标的测定与分析,探索其抵御热胁迫的生理响应机制,为美容杜鹃的低海拔地区引种和耐热品种选育提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

美容杜鹃采自峨眉山雷洞坪,由四川大学白洁副教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导分化和不定芽的形成 参照罗彭^[4]及 Mertens 等^[5]对高山杜鹃的组培,设计三因素三水平的正交实验,分别以 MS(高盐,铵盐/硝酸盐=0.5,低铁盐)、改良 MS(低盐,铵盐/硝酸盐=0.5,高铁盐)和 Read(低盐,铵盐/硝酸盐=1,低铁盐)^[8]为基本培养基(0.3 g/L 蔗糖,0.6 g/L 琼脂,pH 5.4),根据实验设计选用不同浓度 NAA 和 TDZ。将美容杜鹃叶片用洗衣粉浸泡和冲洗后,用 70% 乙醇浸泡 0.5 min,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% 氯化汞浸泡 6 min,无菌水冲洗 5 次后,将叶片切成 5 mm×5 mm 的小块,正面朝上接种在培养基上,每培养皿接种 4 个外植体,5 次重复,暗培养 7 d,观察愈伤组织的生长情况并统计结果。

将未褐化的愈伤组织转接到相同培养基的三角瓶中,放置于(25±2)℃、12 h/d 的 1 600~2 000 lx 光照条件下培养,诱导不定芽。

1.2.2 壮苗培养 将愈伤诱导的不定芽切下接种于壮苗培养基:改良 MS+0.1 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 与 Read+0.1 mg/L KT+0.2 mg/L NAA,放置于(25±2)℃、12 h/d 的 1 600~2 000 lx 光照条件下培养 15 d,进行壮苗培养。

1.2.3 生根培养与炼苗移栽 将经过壮苗培养后的丛生苗分割成单株,接种于 1/2 改良 MS 基本培养基上,添加植物生长调节物质 GA₃(浓度分别为

0、0.5、1、1.5、2 和 2.5 mg/L)。每瓶接种 6 株,每组 5 瓶,放至 1.2.2 相同条件下进行生根培养。根长至 3~6 cm 时,将瓶口揭开,在室内炼苗 4 d,洗去根部培养基,移栽至混合土壤(蛭石:营养土=1:1),用 1/10 MS 浇灌至土壤湿度保持在 40%,1 周后正常管理。

1.2.4 美容杜鹃愈伤组织热胁迫下生理指标的测定 将继代 1 次的愈伤组织于 38 ℃、40% 湿度、12 h/d 光照(1 600~2 000 lx)的人工气候箱进行热胁迫处理,分别测定 0、3、6、9、12 和 24 h 的生理指标,3 次重复。其中,MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法;可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法;蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法;脯氨酸含量测定采用茚三酮比色法;SOD 和 POD 活力分别采用总超氧化物歧化酶和过氧化物酶试剂盒测定,并用 SPSS 统计分析数据的显著性。

2 结果与分析

2.1 激素及培养基对愈伤组织诱导、芽分化和不定芽增殖影响

根据正交试验,分别统计外植体培育 1 周后愈伤组织的诱导率、4 周后芽分化诱导率和平均出芽个数(表 1)。其中,Read+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L TDZ 的愈伤组织诱导率、芽分化诱导率和平均出芽数最高,分别为 95%、80% 和 12.2 个。

通过 SPSS 软件分析各基本培养基、激素浓度对愈伤组织诱导(图 1,A)、芽分化诱导(图 1,B)及平均出芽个数的影响^[9](表 2)。因极差越大表明影响越显著且在 0.05 水平差异显著,所以基本培养基对愈伤组织诱导率影响最显著,NAA 对芽分化诱导和平均芽数影响最显著。据这 3 种基本培养基对愈伤组织诱导率平均值分析,影响因素依次为 Read>改良 MS>MS,据 NAA 对芽分化诱导率和平均芽数影响平均值分析,NAA 浓度为 0.1 mg/L 效果最好。据以上分析,可得出最佳愈伤组织诱导率、分化和丛生芽增殖培养基组合为 Read+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L TDZ。

2.2 壮苗、生根与炼苗移栽

改良 MS 为基本培养基中苗长势壮而高,叶片更绿,后期更易诱导生根培养(图 1,C),但在 Read 基本培养基中的苗大多纤细矮小(图 1,C')。故壮苗最佳培养基为改良 MS+0.1 mg/L KT+0.2 mg/L NAA。

在 1/2 改良 MS 生根培养基中,生根率与 GA₃

表1 不同培养基和激素对美容杜鹃愈伤组织诱导、芽分化和增殖的效果

Table 1 The effects of callus induction, bud differentiation and proliferation of *R. calophytum*

处理号 Treatment code	正交试验 Orthogonal experiment			愈伤组织诱导率 Induction rate of calli/%	芽分化诱导率 Rate of bud differentiation/%	平均出芽个数 Average number of induced buds
	基本培养基 Basal medium	NAA /(mg/L)	TDZ /(mg/L)			
1	改良 MS Improved MS	0.05	0.2	75	35	3.3
2	改良 MS Improved MS	0.1	0.5	85	60	8.9
3	改良 MS Improved MS	0.2	0.8	60	25	2.8
4	MS	0.05	0.5	40	6.7	3.6
5	MS	0.1	0.8	75	50	8.4
6	MS	0.2	0.2	55	28.6	3.4
7	Read	0.05	0.8	80	8	1.2
8	Read	0.1	0.2	95	80	12.2
9	Read	0.2	0.5	85	25	4.3

注:愈伤组织诱导率=产生愈伤组织块数/接种总块数×100%;芽分化诱导率=产生芽的组织块数/愈伤组织的块数×100%;平均出芽个数=出芽总数/出芽愈伤组织块数。

Note: Induction rate of callus=callus blocks/total number of inoculation×100%; Induction rate of buds=number of callus blocks with buds/total number of callus blocks×100%; Average number of buds=total number of buds/total number of callus blocks with buds.

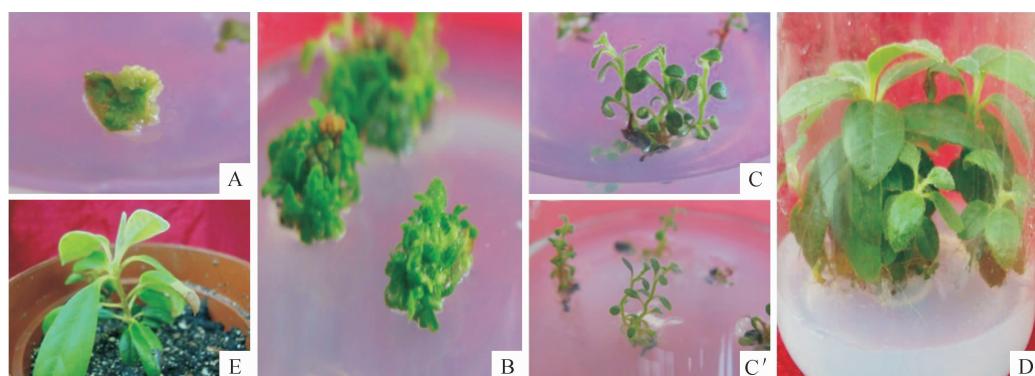


图1 美容杜鹃叶片再生体系建立

A. 愈伤组织;B. 不定芽的诱导;C. 改良 MS 壮苗培养;C'. Read 壮苗培养;D. 生根培养;E. 移栽

Fig. 1 The establishment of *R. calophytum* blades segments regeneration system

A. Callus; B. Induction of adventitious bud; C. Plantlet strengthening culture of improved MS;
C'. Plantlet strengthening culture of Read; D. Rooting culture; E. Transplant of seedlings

表2 SPSS 软件分析不同培养基和激素对愈伤组织诱导、芽分化和增殖影响

Table 2 Analysis of medium and hormones on callus induction, bud initiation and bud propagation of *R. calophytum* by SPSS

项目 Project		基本培养基 Basal medium	NAA/(mg/L)	TDZ/(mg/L)
愈伤组织诱导率 Induction rate of callus/%	X1	73.3b	65.0a	75.0a
	X2	56.7c	85.0a	70.0a
	X3	86.7a	66.7a	71.7a
	极差 R	30.0	20.0	3.3
芽分化诱导率 Rate of bud differentiation/%	X1	40.0a	16.7b	48.3a
	X2	29.0a	63.3a	45.0a
	X3	37.7a	26.7b	27.7a
	极差 R	11.0	46.7	20.7
平均出芽个数 Average number of induced buds	X1	5.0a	2.7b	6.3a
	X2	5.1a	9.8a	5.6a
	X3	5.9a	3.5ab	4.1a
	极差 R	0.9	6.3	0.7

注:Xi 是每个因素第 i 水平结果平均数;不同小写字母表示处理间在 0.05 水平上的差异显著。

Note: Xi stands for average number on level i of each factor. The different normal letters indicate significant different among treatment at 0.05 level.

浓度在0~2 mg/L时呈正相关(表3),培养基中的GA₃浓度为2 mg/L时生根率达到98.7%,根长且密,3周后根显著增长且变粗,幼苗叶片浓绿,生长健壮(图1,D)。GA₃超过2 mg/L时生根率下降,根细而长。故最佳的生根培养基为:1/2改良MS+1.5%蔗糖+0.6%琼脂+2 mg/L GA₃。当根长至3~6 cm时即可移栽至混合土壤中(图1,E)。

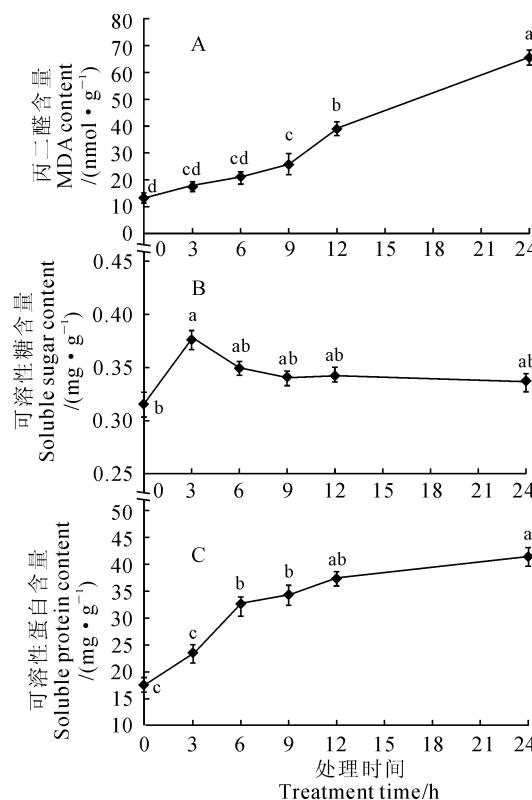
2.3 热胁迫对美容杜鹃愈伤组织生理指标的影响

生理指标的变化反映出热胁迫对植物生长代谢影响^[10]。测定美容杜鹃愈伤组织38℃热胁迫下各

表3 生根培养基优化

Table 3 The optimization of rooting culture medium

编号 Number	培养基 Medium/(mg/L)	生根率 Rooting percentage/%
1	1/2 改良 MS 1/2 improved MS	20.3
2	1/2 改良 MS+GA ₃ 1 mg/L 1/2 improved MS+GA ₃ 1 mg/L	34.5
3	1/2 改良 MS+GA ₃ 1.5 mg/L 1/2 improved MS+GA ₃ 1.5 mg/L	44.4
4	1/2 改良 MS+GA ₃ 2 mg/L 1/2 improved MS+GA ₃ 2 mg/L	98.7
5	1/2 改良 MS+GA ₃ 2.5 mg/L 1/2 improved MS+GA ₃ 2.5 mg/L	96.8



生理指标(图2),并采用Duncan法分析。

2.3.1 丙二醛含量 植物在逆境条件下常发生膜脂过氧化作用而产生丙二醛(MDA)^[11]。愈伤组织的MDA含量在热胁迫处理时间0~9 h时增加缓慢且含量相对较低,随着处理时间的延长,MDA含量迅速增加(图2,A)。数据分析显示,MDA含量随时间变化显著,因此可作为美容杜鹃耐热品种筛选的参考指标。

2.3.2 渗透调节物质含量 可溶性糖含量随着热胁迫时间延长出现先增后降趋势(图2,B),但其仅在热胁迫3 h时有显著差异,而其整体差异不显著,故不适合作为美容杜鹃的耐热品种筛选参考指标。

植物可溶性蛋白含量与保水力密切相关,其合成及降解速率与植物耐热性有关^[12]。可溶性蛋白含量随着热胁迫时间的增加呈上升趋势(图2,C),前期诱导尤为明显,但是随着热胁迫时间延长,细胞受到损伤不可修复,可溶性蛋白含量增加减缓。热胁迫处理前后可溶性蛋白含量变化明显,通过Duncan分析可作为美容杜鹃耐热品种筛选的参考指标。

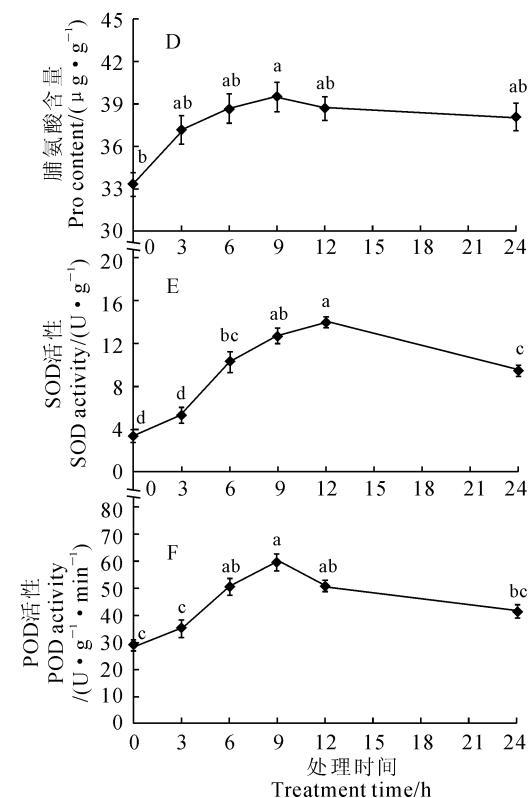


图2 热胁迫对美容杜鹃愈伤组织生理指标的影响

不同小写字母表示处理时间在0.01水平上的差异显著

Fig. 2 Effects of heat stress on physiological indexes in the calli from *R. calophytum*

The different normal letters indicate significant difference among treatments time at 0.01 level

脯氨酸不仅可以调节细胞质渗透压,平衡植物细胞酸度,稳定细胞大分子结构,还具有细胞氧化还原势调节作用^[12]。热胁迫前6 h,脯氨酸含量与时间呈正相关,6 h后含量趋于稳定(图2,D)。通过对脯氨酸Duncan分析,其整体随时间变化差异不显著,并不适用于美容杜鹃的耐热品种筛选。

2.3.3 抗氧化酶活性 SOD能清除活性氧,是评价植物抵抗逆境能力的重要指标。热胁迫0~9 h内,SOD随着时间延长而快速增加,可能由于热胁迫产生活性氧诱导SOD的活性;而12 h以后SOD活性随着时间的增加开始下降(图2,E),这可能随着热胁迫时间的增加,抗氧化酶系统遭到破坏,导致膜脂过氧化作用加剧^[13],SOD活性下降。POD能够催化过氧化物分解^[14]。随着时间的延长,POD活性先升高后降低,热胁迫9 h时达到最大值(图2,F)。经过Duncan分析,SOD及POD活性随时间变化显著,可作为美容杜鹃耐热品种筛选的辅助参考指标。

3 讨论

3.1 美容杜鹃叶片再生体系建立

实验采用叶片获得再生苗,与罗彭等^[4]建立的茎段再生体系相比,具有以下优势:(1)叶片较茎段具有数量优势,且初处理更简单;(2)叶片愈伤组织诱导率和出芽数比茎段的高;(3)叶片再生体系中愈伤组织诱导和芽分化采用同一培养基,较茎段再生体系所采用的2种培养基具有简化步骤、缩短时间和节约资源的优点。

采用3种基本培养基作为愈伤组织诱导和分化培养,影响因素为Read>改良MS>MS,与王亦非等^[15]对两种西洋杜鹃组培的研究结果相一致。可能原因是美容杜鹃的愈伤组织诱导与分化更偏好低浓度的盐分、高比例NH₄/NO₃的培养基。由于离子的选择吸收现象,NH₄⁺用作养分时会使外部环境酸化,NO₃⁻碱化^[16-17],美容杜鹃在野外实地生长喜好酸性土壤,因此高比例NH₄/NO₃培养基应有利于愈伤组织的诱导、分化和增殖。其中NAA浓度为0.1 mg/L时对美容杜鹃诱导丛生芽的影响显著,过

高或过低浓度均不利于愈伤组织丛生芽的诱导^[18]。

采用Read和改良MS为壮苗基本培养基,其中改良MS培养苗更健壮,叶片更绿,可能是改良MS的高铁盐更有利于植物的叶绿素合成,加强了美容杜鹃壮苗的生长。此外,采用1/2改良MS生根基本培养基,附加2.0 mg/L的GA₃有助于芽快速萌发和生长,促进生根,这与顾地周等^[19]对烈香杜鹃快繁研究结果一致。

3.2 愈伤组织耐热性生理指标

通过对愈伤组织热胁迫生理指标进行测定分析,可知美容杜鹃热胁迫下生理指标与耐热性存在相关性。在热胁迫下,产生了大量的有害物质MDA;同时美容杜鹃也启动应急的抗氧化等防御系统^[20];通过调节体内脯氨酸(Pro)、可溶性糖和可溶性蛋白质物质,来保护生物大分子的功能结构、细胞膜结构,维持细胞的膨压来抵御或减轻热胁迫伤害^[21]。其中,可溶性蛋白含量、MDA含量变化最显著,SOD和POD活性在处理前期变化也比较明显,这4项指标结合其热胁迫下的形态表现,可为今后美容杜鹃抗高温品种的选育评价及其栽培管理提供理论依据。

3.3 愈伤组织耐热性研究意义

植物为抵御高温胁迫已经进化了许多耐高温机制,包括维持膜的稳定性、合成抗氧化物质、积累渗透调节物质等。通过对美容杜鹃的愈伤组织热胁迫中生理指标的研究,初步分析和揭示了愈伤组织适应热胁迫的生理响应物质。相较生长于冷凉环境条件下的美容杜鹃而言,实生苗难以在低海拔地区大量栽培成活;同时,从愈伤组织到再生植株过程中组培苗会有较大差异分化。通过测定分析愈伤组织热胁迫下的生理指标虽然和实生苗会有差异,但是用叶片诱导的愈伤组织具有与野生植株相同的遗传特征,且容易获得遗传背景较为一致的材料,因此在本试验中,以愈伤组织为材料研究其对高温胁迫的生理响应,可为探讨美容杜鹃抵御耐热机制提供完整认识,同时为基因改良杜鹃耐热品质打下基础,也为高山杜鹃在引种过程中减缓伤害提供可行途径和科学参考依据。

参考文献:

- [1] QIN SH H(秦胜红).Emei genus *Rhododendron* plant resources research[J].*Journal of Chengdu University of TCM*(成都中医药大学),2004,27(3):56—57(in Chinese).

- [2] FU X L(付先龙), LIN Y(林颖). Analysis on the volatile oils from *Rhododendron calophytum* Franch by GC-MS[J]. *Lishizhen Medicine and Materiamedica Research*(时珍国医国药), 2008, **19**(4): 931—933(in Chinese).
- [3] LI CH H(李长慧), SUN H Q(孙海群). A study on germination percentage for *Rhododendron przewalskii* seeds[J]. *Journal of Qinghai University*(青海大学学报), 1998, **16**(3): 15—17(in Chinese).
- [4] LUO P(罗彭), ZHUANG P(庄平), BAI J(白洁). Tissue culture of *Rhododendron decorum* Franch., *Rhododendron calophytum* Franch. and *Rhododendron discolor* Franch[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学通讯), 2007, **43**(2): 326(in Chinese).
- [5] MERTENS M, WERBROUCK S, SAMYN G. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves[J]. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1996, **45**: 231—236.
- [6] PREECE J E, IMEL M R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron ‘P J M Hybride’*[J]. *Scientia Horticulturae*, 1991, **48**: 159—170.
- [7] QIN J Y(秦静远), HUANG Y M(黄玉敏). Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron simsii*[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学通讯), 2003, **39**(1): 38(in Chinese).
- [8] MIAO Y M(苗永美), JIAN X(简兴). The research of *Rhododendron* tissue culture[J]. *Northern Horticulture*(北方园艺), 2004, (3): 76—77(in Chinese).
- [9] HE F L(何芳兰), TAO Y ZH(陶延珍). Effect of growth regulators on callus differentiation and plant regeneration of *Rhododendron delavayi*[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*(甘肃农业大学学报), 2007, **42**(1): 68—72(in Chinese).
- [10] ZHANG Y H(张乐华), ZHOU G(周广). Physiological and biochemical effects of high temperature stress on the seedlings of two *Rhododendron* species of subgenus *Hymenanthes*[J]. *Plant Science Journal*(植物科学学报), 2011, **29**(3): 362—369(in Chinese).
- [11] WANG K H(王凯红), LIU X P(刘向平). Physiological-biochemical response of five species in *Rhododendron* L. to high temperature stress and comprehensive evaluation of their heat tolerance[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 2011, **20**(3): 29—35(in Chinese).
- [12] 周广. 高温胁迫对7种杜鹃生理生化特性的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2010.
- [13] ZHOU G(周广), SUN B T(孙宝腾). Responses of antioxidant system in leaves of *Rhododendron jinggangshanicum* to high temperature stress[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2010, **30**(6): 1 149—1 156(in Chinese).
- [14] YAN CH SH(阎成仕), LI D Q(李德全), ZHANG J H(张建华). Plant leaf senescence and oxidative stress[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 1999, **16**(4): 398—404(in Chinese).
- [15] WANG Y F(王亦非), SUN Y F(孙月芳), ZHOU R H(周润海). Rapid propagation of *Rhododendron hybridum*[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*(上海农业学报), 2003, **19**(2): 9—11(in Chinese).
- [16] ZHONG Y(钟宇), ZHANG J(张健), LUO C H D(罗承德), et al. A study on the technique system of tissue culture in *Rhododendron hybrida*(I)-selection of medium and explant[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报), 2001, **19**(1): 37—39(in Chinese).
- [17] QIU L(邱璐), LIANG X H(梁晓华), HUANG J(黄静). The research progress of *Rhododendron* tissue culture[J]. *Journal of Anhui Sci.*, 2005, **33**(9): 1 717—1 719(in Chinese).
- [18] XIAO D M(肖冬梅), XUAN Y H(宣艳辉), ZHU G J(朱光杰), et al. Study on rapid propagation of *Rhododendron triflora*[J]. *Northern Horticulture*(北方园艺), 2010, (23): 140—142(in Chinese).
- [19] GU D ZH(顾地周), LU SH(陆爽), BA CH Y(巴春影). Axillary multiple shoots induction from the young stems and plantlet regeneration of *Rhododendron anthopogonoides* Maxim[J]. *Journal of Northwest A&F University*(Nat. Sci. Edi.) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2012, **40**(9): 209—213(in Chinese).
- [20] GÜR A, DEMIREL U, ÖZDEN M, et al. Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton(*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Biotechnol.*, 2010, **9**(7): 1 008—1 015.
- [21] OZDEN M, DEMIREL U, KAHRAMAN A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine(*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2 [J]. *Sci. Hortic.*, 2009, **119**(2): 163—168.