

冠菌素对不同钾水平下TTC法测定的棉花根系活力的影响

张志勇*, 卜晶晶, 王素芳, 胡根海, 王清连

河南科技学院/现代生物育种河南省协同创新中心, 河南新乡453003

摘要: 冠菌素可以提高棉花根系还原氯化三苯四唑(TTC)生成三苯甲腓(TF)的能力, 本文研究了不同钾水平下冠菌素处理后的TF值在不同提取方法之间的差异及其与根系多酚和呼吸速率之间的关系。结果显示, TF热提取法的测定值明显高于常温提取法, 尤其是冠菌素处理条件下。冠菌素处理后TF的OD₄₈₅值明显高于OD₅₂₀值, 和冠菌素显著提高根系中花青素含量具有一致性。冠菌素处理显著提高了煮沸根和烘干根的TTC还原量, 与显著提高根系多酚含量具有一致性。冠菌素显著提高了新鲜根系的TTC还原量, 如其单位质量鲜根的OD₅₂₀值分别是高钾和低钾的5.4和5.9倍(热提取法)或6.1和4.1倍(常温提取法), 同时显著提高了根系多酚含量及单位质量的呼吸速率, 这表明TTC还原能力可以用于表示冠菌素对根系代谢活性的促进, 而不受多酚的影响。

关键词: 多酚; 呼吸速率; 花青素; TF热提取法; TF常温提取法

Effect of Coronatine on Cotton Root Activity Determined by TTC Assay at Different Levels of Potassium

ZHANG Zhi-Yong*, BU Jing-Jing, WANG Su-Fang, HU Gen-Hai, WANG Qing-Lian

Henan Institute of Science and Technology/Henan Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding, Xinxiang, Henan 453003, China

Abstract: Coronatine can improve the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction to triphenylformazan (TF) in cotton root. In this paper, we studied the differences of TF value in the different extraction methods with COR treatment under the different levels of potassium and their relationship between root polyphenol and respiration rate. The results showed that TF values of hot extraction were obviously higher than those of room temperature extraction, especially with COR treatment. The absorbance values at 485 nm with COR treatment were obviously higher than those at 520 nm, which was the same with anthocyanin contents increased by COR. And COR treatment significantly increased the TTC reduction of boiled and dry root, in accordance with polyphenols contents enhanced by COR. COR treatment significantly enhanced TTC reduction of fresh root. Compared with high K and low K respectively, OD₅₂₀·g⁻¹ (FW) were 5.4 and 5.9 times (hot extraction method) or 6.1 and 4.1 times (room temperature extraction), and significantly improved the polyphenol content and root respiration rate. Therefore, TTC reduction can be used to indicate metabolic activity increased by COR independent of polyphenols contents.

Key words: polyphenols; respiratory rate; anthocyanins; hot extraction method of TF; room-temperature extraction of TF

氯化三苯四唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)通常是无色的, 当其被活细胞中的脱氢酶还原时就会变成红色三苯甲腓(triphenylformazan, TF) (Richter等2007)。TTC直接从电子传递链接受电子(Altman 1976; Clemensson-Lindell 1994; Byth等2001), 其还原直接与线粒体呼吸速率相关(Comas等2000; Ruf和Brunner 2003)。因此, TTC常作为细胞活性量化指示剂(Steponkus和Lanphear 1967), 良好的根系代谢活性反应剂(Comas等2000)和用于评价植物对逆境的响应, 如黄瓜对冷

的响应(Kang和Saltveit 2002)、小麦对热的响应(Terzioglu等2006)、云杉和松树对氮缺乏的响应(Clemensson-Lindell 1994)以及剪股颖草对水分胁迫的响应(Merewitz等2011)。

在根系生理研究方面, TTC反应通常用于区分细根的活和死, 以及用于评价植物细根的活力

收稿 2014-12-22 修定 2015-04-30
资助 国家自然科学基金(31271648)和河南省杰出青年基金(1141-00510008)。

* 通讯作者(E-mail: z_zy123@126.com; Tel: 15090438465)。

大小(Clemensson-Lindell 1994; Comas等2000; Ruf和Brunner 2003; Sturite等2005)。这些研究中通常以煮沸的根系作为对照,有的研究结果表明煮沸过的细根TTC还原能力小,和死亡细根的反应活性具有可比性(Ruf和Brunner 2003; Sturite等2005);有的研究结果表明煮沸过的细根TTC还原能力仍然较高(Clemensson-Lindell 1994; Comas等2000)。

多酚具有抗氧化性和自由基清除能力(Rice-Evans等1997; Hättenschwiler和Vitousek 2000; Kraus等2003; Karonen等2004; Dixon等2005),和四唑盐有很强的反应活性(Galato等2001; Aehle等2003; Franke等2004)。Richter等(2007)以煮沸的树木根系做实验发现,根系中的活性物质如多酚能还原TTC。TF提取通常有热提取法(Clemensson-Lindell 1994; Comas等2000; Lassheikki等1991; Clemensson-Lindell和Persson 1995; Stattin和Lindström 1999; Zhu等2000; Brunner等2002; Chen等2006)和常温提取法(Chen等2000; Byth等2001; Ruf和Brunner 2003; Yamauchi等2014)两种方法,其中以前者最为常用,并且前者的TF值高于后者(Ruf和Brunner 2003)。我们的实验结果表明,冠菌素在显著提高了棉花根系TTC还原量的同时,显著提高了多酚含量。由此,本文探索不同钾水平下冠菌素处理后的TF值在不同提取方法之间的差异,以及评价冠菌素提高棉花根系TTC还原量以及其对呼吸强度的影响。

材料与方 法

1 材料和培养条件

试验在培养室开展,用棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种‘岱字棉99B (DP99B)’作为实验材料。培养室白天温度为30 °C,时间14 h;晚上温度25 °C,时间10 h。光照强度为450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

挑选整齐一致的棉花种子,用10%双氧水消毒30 min,用自来水冲洗3次后,在自来水中浸泡12 h。浸泡过后的种子置于湿沙子中萌发和出苗。整齐的刚出土(子叶展开)的幼苗转移到含不同钾离子浓度的培养液中。培养盒尺寸为20 cm×13 cm×15 cm,含3.9 L培养液。钾离子浓度分别为2.5和0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl,低钾条件下,NaCl用于平衡

K离子。其它营养元素为2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 2×10^{-4} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 、 1×10^{-3} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4 、0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-FeNa、 2×10^{-2} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3BO_3 、 5×10^{-6} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 和 1×10^{-3} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnSO_4 。转移培养3 d后,添加10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 冠菌素(coronatine, COR)。培养液用气泵连续通气,每天pH调整为7.0。

4种处理分别为高钾(HK)、低钾(LK)、高钾+冠菌素(HK+COR)和低钾+冠菌素(LK+COR);LK/HK表示LK条件下的测定指标值与相应HK条件下的测定指标值的比值,依次类推。每个处理为3个重复(3盒),每盒种植8棵棉花幼苗。钾处理11 d即冠菌素处理8 d时,不同处理下各自整齐一致幼苗的根系用去离子水冲洗去除表面的电解质,收集距根茎交界处4~5 cm以下部位的根系,用于测定以下生理生化特性。

2 测定指标

2.1 氯化三苯四唑(TTC)还原量测定

TTC还原成不溶性的红色三苯甲臞(TF),可用于表示根系活力(Comas等2000; Brunner等2002; Chen等2006; Yamauchi等2014)。采用下列4种方法测定TTC还原量,其中方法3和方法4用于鉴定除电子呼吸链传递电子还原TTC外的其它还原TTC物质如多酚的存在。

方法1 (新鲜根+热提取):称重新鲜根系(鲜根重量表示为FW),在黑暗和30 °C条件下,将其充分浸泡于0.6% (W/V) TTC溶液(TTC溶解在pH 7.0的磷酸缓冲液)中进行染色24 h。用去离子水将染色后的根系冲洗干净并用滤纸沾干,直接将根系浸泡在5 mL 95%乙醇,在85 °C水浴条件下放置20 min。TF提取液分别在485和520 nm测定吸光值,提取过TF的根系用去离子水冲洗后烘干并称干重(DW),根系活力分别表示为 $\text{OD}_{485}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)、 $\text{OD}_{520}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)、 $\text{OD}_{485}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)和 $\text{OD}_{520}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。

方法2 (新鲜根+常温提取):其他步骤同方法1,区别是TF提取是染色根系在室温条件下用95%乙醇研磨提取,提取时间为30 min。

方法3 (煮沸根+热提取):其他步骤同方法1,区别是新鲜根称重后先沸水浴10 min,再染色。

方法4 (烘干根+热提取):其他步骤同方法1,

区别是新鲜根烘干称重后再研磨染色, 而后提取。

2.2 干物质积累量测定

新鲜根系称重后, 105 °C杀青30 min, 75 °C烘干至恒重, 称量。干物质积累量表示为g (DW)·100 g⁻¹ (FW)。

2.3 呼吸速率测定

参考Comas等(2000)描述的方法。将从根茎交界处剪下的根系对应(即高钾培养的幼苗放置到高钾溶液, 而低钾培养的幼苗放置到低钾溶液)放置到预先充分通气的营养液中(放置根系前测定其溶解氧含量), 放置70~100 min后测定其中溶解氧含量。

2.4 多酚含量测定

多酚含量测定采用福林酚法(Thusoo等2014)。约0.5 g新鲜根系, 剪碎, 用5 mL 80%乙醇在沸水浴条件下提取15 min, 3 000×g离心15 min。取0.5 mL上清液与福林酚稀释液(福林酚:水为1:2)混合反应5 min后, 加入0.5 mL 20%碳酸钠, 反应90 min后, 用分光光度计在745 nm处测定吸光值。多酚含量的定量用没食子酸做标线进行。

2.5 花青素测定

花青素的提取和定量依据Gould等(2000)的方

法。黑暗、4 °C和震荡条件(150 r·min⁻¹)下, 根系浸泡在1 mL的盐酸和甲醇混合液(3 mol·L⁻¹盐酸:去离子水:甲醇的体积比为1:3:16)中, 提取花青素12 h。离心后, 上清液中的花青素用分光光度计法在530 nm处测定, 根系中花青素含量表示为单位质量新鲜根系中花青素的百分比。

3 数据统计

试验重复3次, 各次结果趋势一致, 取其中一次的数值进行统计分析。用SAS的Duncan's multiple range test法对平均值进行比较($P \leq 0.05$)。

实验结果

1 冠菌素对不同钾水平下棉花根系TTC还原量的影响

4种方法均显示, 同一测定方法和处理条件下, 不同的TTC还原量表示方法之间存在明显差异, 即OD₄₈₅·g⁻¹ (DW) > OD₅₂₀·g⁻¹ (DW) > OD₄₈₅·g⁻¹ (FW) > OD₅₂₀·g⁻¹ (FW) (表1)。在同一测定方法(除方法3)和TTC还原量表示方法下, 不同处理的TTC还原量顺序为HK+COR > LK+COR > HK > LK。

方法1结果(表1)显示, 不同处理的TTC还原量之间均存在显著差异。和高钾相比, 低钾显著降

表1 冠菌素对不同钾水平下棉花TTC还原量的影响

Table 1 Effects of coronatine COR on TTC reduction of cotton under different K levels

测定方法	处理	TTC还原量			
		OD ₄₈₅ ·g ⁻¹ (FW)	OD ₅₂₀ ·g ⁻¹ (FW)	OD ₄₈₅ ·g ⁻¹ (DW)	OD ₅₂₀ ·g ⁻¹ (DW)
方法1 (新鲜根+热提取)	HK	0.73 ^e	0.56 ^e	27.18 ^e	20.81 ^c
	LK	0.37 ^d	0.27 ^d	13.12 ^d	9.81 ^d
	HK+COR	4.03 ^a	3.03 ^a	114.35 ^a	85.94 ^a
	LK+COR	2.24 ^b	1.61 ^b	53.12 ^b	38.17 ^b
方法2 (新鲜根+常温提取)	HK	0.39 ^e	0.30 ^e	13.00 ^e	10.04 ^c
	LK	0.24 ^d	0.17 ^d	10.89 ^e	7.92 ^c
	HK+COR	2.43 ^a	1.83 ^a	66.76 ^a	50.27 ^a
	LK+COR	1.02 ^b	0.71 ^b	28.31 ^b	19.73 ^b
方法3 (煮沸根+热提取)	HK	0.08 ^d	0.05 ^d	2.67 ^d	1.82 ^d
	LK	0.18 ^c	0.12 ^c	5.43 ^c	3.58 ^c
	HK+COR	0.76 ^a	0.53 ^a	18.56 ^a	13.08 ^a
	LK+COR	0.39 ^b	0.25 ^b	8.77 ^b	5.54 ^b
方法4 (烘干根+热提取)	HK	-	-	9.84 ^c	6.90 ^c
	LK	-	-	6.98 ^d	5.03 ^c
	HK+COR	-	-	18.29 ^a	12.63 ^a
	LK+COR	-	-	13.56 ^b	9.05 ^b

同一列同一方法不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平不同处理之间差异显著; -: 无测定值。

低了TTC还原量。而无论高钾还是低钾处理下,冠菌素均显著提高了TTC还原量。和方法1相比,方法2结果显示高钾处理的TTC还原量(干根)高于低钾处理的,但差异不显著。同一处理下方法1测定的TTC还原量明显大于方法2,不同处理之间差异幅度不一样。添加冠菌素处理的根系活力(鲜根)是不添加冠菌素的4.1~6.2倍,方法1测定的HK+COR是HK的5.4~5.5倍,LK+COR是LK的5.9~6.1倍;而方法2测定的HK+COR是HK的6.1~6.2倍,LK+COR是LK的4.1~4.2倍。

方法3和方法4测定结果(表1)也显示冠菌素显著提高了TTC还原量。方法3结果显示,低钾处理的TTC还原量显著高于高钾处理的,这与其他三种方法都不同。同一处理下,方法3和方法4测定的TTC还原量明显小于方法1和方法2,但不同处理间差异幅度不一样。

2 冠菌素对不同钾水平下棉花根系干物质积累量和呼吸速率的影响

低钾处理显著降低了根系干物质积累量,是高钾处理的85%。冠菌素处理显著提高了根系干物质积累量,分别是高钾和低钾的1.4和1.5倍(图1)。

和高钾相比,低钾处理的根系呼吸能力显著降低,单株根系呼吸速率和单位质量根系呼吸速率分别是高钾的41%和62%(图2)。冠菌素则显著促进了根系的呼吸能力,单株根系呼吸速率和单位质量根系呼吸速率分别是对应高钾的1.9和3.7倍,是对应低钾的7.0和8.3倍(图2)。

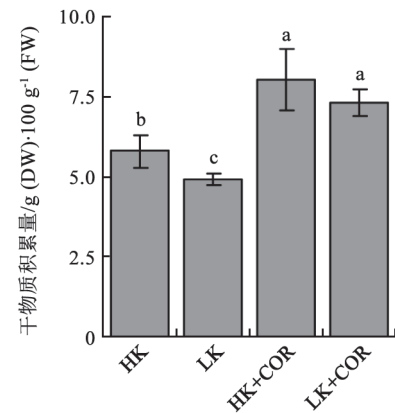


图1 冠菌素处理对不同钾水平下棉花根系干物质积累量的影响

Fig.1 Effects of COR on dry matter accumulation of cotton root under different K levels

图中数值为平均值±标准偏差,重复数为5,不同的小写字母表示在 $P<0.05$ 水平不同处理之间差异显著。下图同此。

3 冠菌素对不同钾水平下棉花根系多酚含量和花青素含量的影响

和高钾相比,低钾处理的根系多酚含量和花青素含量没有显著变化。冠菌素显著促进了根系多酚和花青素含量,COR+HK处理的多酚和花青素含量是HK的3.3和3.6倍;COR+LK处理的多酚和花青素含量是LK的3.1和4.5倍(图3)。

讨论

植物研究中最常用的四唑盐是TTC,其还原生产的TF溶液吸光值通常在485 nm处测定,但是

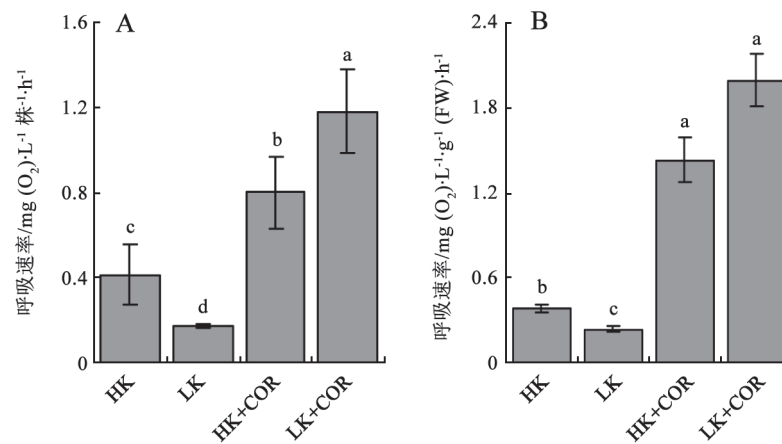


图2 冠菌素处理对不同钾水平下棉花根系呼吸速率的影响

Fig.2 Effects of COR on respiratory rate of cotton roots under different K levels

A: 单株根系呼吸速率; B: 单位质量根系呼吸速率。

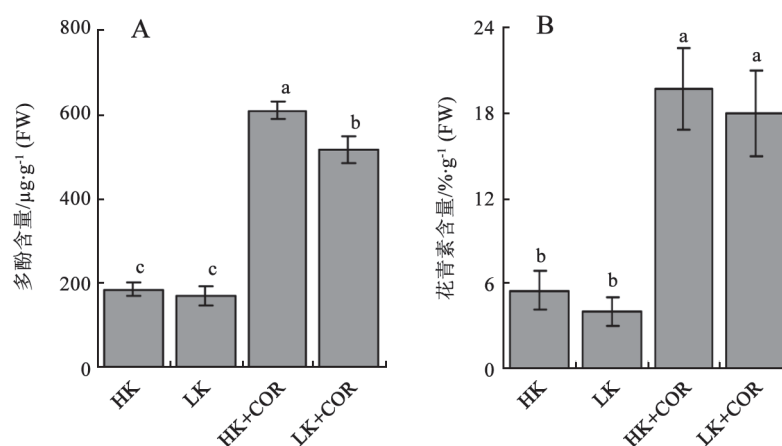


图3 冠菌素处理对不同钾水平下棉花根系多酚和花青素含量的影响

Fig.3 Effects of COR on polyphenolics and anthocyanins contents of cotton roots under different K levels

在485 nm处的吸光值有可能受到内源植物色素的干扰, 所以也可以选择520 nm处测定吸光值, 避免内源植物色素的干扰(Steponkus和Lanphear 1967; Ruf和Brunner 2003)。本实验结果也表明520 nm处吸光值均小于485 nm (表1), 说明在485 nm处测定TF值会受到内源植物色素的干扰。进一步对比发现, 冠菌素处理下, 吸光值下降幅度(485 nm 的TF值减去520 nm的TF值)明显大于不添加冠菌素, 这表明冠菌素刺激了某种色素物质的生产。花青素是自然色素, 属于类黄酮家族。许多果实和蔬菜呈现蓝色、紫色和红色通常是由花青素引起(Middleton等1993)。本研究结果表明, 冠菌素显著提高了棉花根系中花青素含量, 高达3.6~4.5倍(图3-B), 这与冠菌素显著提高西红柿幼苗中花青素含量的报道(Uppalapati等2005)一致。这表明冠菌素处理后, TF在485 nm的吸光值明显高于520 nm, 可能与花青素含量升高有关。因此, 为避免花青素对根系TTC还原量的影响, 下文讨论中选择用520 nm的TF值。

根系活力(TTC还原量)受到植物生长调节剂的正向调节, 如外施脱落酸提高了水稻的根系活力(Chen等2006), 外施乙烯前体(1-氨基环丙烷-1-羧酸)提高了缺氧条件下小麦的根系活力(Yamauchi等2014), 外施包含赤霉素3和吲哚丁酸的植物生长调节剂-IV提高了棉花的根系活力(Atkins 1992; Clark等1992)以及提高内源细胞分裂素促进了匍匐剪股颖草的根系活力(Merewitz等2010)。本研究中显示, 冠菌素显著提高了棉花根系活力(表1), 进而促进了干物质的积累(图1)。

TF热提取时温度通常在80 °C或以上(Clemensson-Lindell 1994; Comas等2000; Lassheikki等1991; Clemensson-Lindell和Persson 1995; Stattin和Lindström 1999; Zhu等2000; Brunner等2002; Chen等2006), 也有温度相对较低的如60 °C (Symeonidou和Buckley 1999; Kalengamaliro等2000)或70 °C (Weidner等1996)。相比较而言, 常温提取法通常需要将根系研磨或过夜提取, 费工或费时; 而热提取在水浴条件下, 快速方便。热提取条件下, 煮沸和死根的根系也会将TTC还原生成TF, 在520 nm处产生了相对高的吸光值(Clemensson-Lindell 1994; Comas等2000)。原因在于热乙醇可以破坏细胞壁, 同时细胞壁成分如纤维素、果胶质和淀粉在温度高于60 °C时将TTC还原为TF; 而在室温条件下, 通过研磨破坏细胞提取TF可以消除细胞壁还原TTC生成TF, 进而在区别不同分级的细根方面获得令人满意和可重复的结果(Ruf和Brunner 2003)。这表明常用的热乙醇(80 °C)提取法会导致由细胞壁成分还原生成TF。本实验结果也表明, 方法1 (新鲜根+热提取法)的测定值均对应明显高于方法2 (新鲜根+常温提取) (表1); 但同时, 两种提取法均能有效区分不同处理对根系活力的影响, 如低钾显著降低了根系活力, 而添加冠菌素均显著提高了根系活力。

根系中的多酚也可以将TTC还原生成TF (Galato等2001; Aehle等2003; Franke等2004)。Beyeler和Heyser (1997)研究发现随着欧洲山毛榉幼苗年龄的增加, 细根中多酚含量增加。而Richter等

(2007)研究发现煮沸根系仍然有较高的多酚含量和TTC活性。由此认为, TTC试验用于成熟树细根根系活力测定会导致根系活力指示的偏差。本实验中, 添加冠菌素显著提高了煮沸根和烘干根的TTC还原活性(表1), 也显著提高了根系中多酚含量(图3-A), 表明冠菌素促进多酚形成可能是其显著提高煮沸根和烘干根TTC活性的一个重要原因。但是, 本实验中, 热提取的新鲜根的TF值 $[\text{OD}_{520} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})]$ 是煮沸根的2.3~10.6倍; 而热提取的新鲜根的TF值 $[\text{OD}_{520} \cdot \text{g}^{-1}(\text{DW})]$ 是烘干根的1.9~6.8倍。因此, 本实验中, 虽然煮沸和死根在一定程度上还原了TTC, 但并不影响方法1区别不同处理对根系活力的影响。

为了证明在方法1(新鲜根+热提取)下, 低钾处理和冠菌素处理分别显著改变TTC还原活性是否相应地反应了其呼吸速率的影响。我们用溶解氧测定仪测定了不同处理对 O_2 的消耗能力(呼吸速率), LK的单位质量根系呼吸速率是HK的62%, COR+HK是HK的3.7倍, COR+LK是LK的8.3倍(图2-B)。而方法1(新鲜根+热提取)测得的 $\text{OD}_{520} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$, LK是HK的49%, COR+HK是HK的5.4倍, COR+LK是LK的5.9倍(表1)。由此可见, 虽然冠菌素显著提高了根系中多酚含量, 但不同处理下根系 O_2 消耗能力和TTC还原活性之间有很好的相关性, 并且作为根系活力评价指标以TTC还原量显示的冠菌素对根系活力的提高幅度并没有一致大于以单位质量呼吸速率显示的冠菌素对根系活力的提高幅度。这表明低钾处理以及冠菌素处理下, 可以用热提取的TTC还原量表示根系代谢活性, 且这种方法相对简单, 效率高。

参考文献

- Aehle E, Raynaud-Le Grandic S, Ralainirina R, Baltora-Rosset S, Mesnard F, Prouillet C, Mazière JC, Fliniaux MA (2003). Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an absorption procedure. *Food Chem*, 86: 579~585
- Altman FP (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochemistry*, 9: 1~56
- Atkins RR (1992). Performance of PGR IV in cotton. *Proc Beltwide Cotton Conferences*.
- Beyeler M, Heyser W (1997). The influence of mycorrhizal colonization on growth in the greenhouse and catechin, epicatechin and procyanidin in roots of *Fagus sylvatica* L. *Mycorrhiza*, 7: 171~177
- Brunner I, Brodbeck S, Walthert L (2002). Fine root chemistry, starch concentration, and 'vitality' of subalpine conifer forests in relation to soil pH. *For Ecol Manag*, 165: 75~84
- Byth HA, Mchunu BI, Dubery IA, Bornman L (2001). Assessment of a simple, non-toxic alamar cell survival assay to monitor tomato cell viability. *Phytochem Anal*, 12: 340~346
- Chen C, Yang Y, Lur H, Tsai Y, Chang M (2006). A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. *Plant Cell Physiol*, 47: 1~13
- Chen WP, Li PH, Chen THH (2000). Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ*, 23: 609~618
- Clark TH, Stutte CA, Ball RK, Guo C (1992). Root activity in cotton as affected by stress and bioregulators. *Proceeding of Beltwide Cotton Conference*
- Clemensson-Lindell A (1994). Triphenyltetrazolium chloride as an indicator of fine-root vitality and environmental stress in coniferous forest stands: applications and limitations. *Plant Soil*, 159: 297~300
- Clemensson-Lindell A, Persson H (1995). Fine-root vitality in a Norway spruce stand subjected to various nutrient supplies. *Plant Soil*, 168/169: 167~172
- Comas LH, Eissenstat DM, Lakso AN (2000). Assessing root death and root system dynamics in a study of grape canopy pruning. *New Phytol*, 147: 171~178
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytol*, 165: 9~28
- Franke SIR, Ckless K, Silveira JD, Rubensam G, Brendel M, Erdtmann B, Henriques JAP (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chem*, 88: 45~55
- Galato D, Ckless K, Susin MF, Giacomelli C, Ribeiro-do-Valle RM, Spinelli A (2001). Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox Rep*, 6: 243~250
- Gould KS, Markham KR, Smith RH, Goris JJ (2000). Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. *Cunn. J Exp Bot*, 51: 1107~1115
- Hättenschwiler S, Vitousek PM (2003). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol Evol*, 15 (6): 238~243
- Kalengamaliro NE, Gana JA, Cunningham SM, Volenec JJ (1996). Mechanisms regulating differential freezing tolerance cultures derived from contrasting alfalfa genotypes. *Plant Cell Tiss Org*, 61: 143~151
- Kang HM, Saltveit ME (2002). Effect of chilling on antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity of high-and low-vigour cucumber seedling radicles. *Plant Cell Environ*, 25: 1233~1238
- Karonen M, Hämäläinen M, Nieminen R, Klika KD, Loponen J, Ovcharenko VV, Moilanen E, Pihlaja K (2004). Phenolic extractives from the bark of *Pinus sylvestris* L. and their effects on inflammatory mediators nitric oxide and prostaglandin E2. *J Agr Food Chem*, 52: 7532~7540
- Kraus TEC, Dahlgren RA, Zasoski RJ (2003). Tannins in nutrient dy-

- namics of forest ecosystems—a review. *Plant Soil*, 256: 41~66
- Lassheikki M, Puttonen P, Räsänen PK (1991). Planting performance potential of *Pinus sylvestris* seedlings as evaluated by root growth capacity and triphenyl tetrazolium chloride reduction methods. *Scand J For Res*, 6: 91~104
- Merewitz EB, Gianfagna T, Huanq B (2011). Photosynthesis, water use, and root viability under water stress as affected by expression of *SAG12-ipt* controlling cytokinin synthesis in *Agrostis stolonifera*. *J Exp Bot*, 62: 383~395
- Middleton E, Kandaswami C, Harborne J (1993). The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman and Hall, London, 619~652
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 2: 1360~1385
- Richter AK, Frossard E, Brunner I (2007). Polyphenols in the woody roots of Norway spruce and European beech reduce TTC. *Tree Physiol*, 27: 155~160
- Ruf M, Brunner I (2003). Vitality of tree fine roots: reevaluation of the tetrazolium test. *Tree Physiol*, 23: 257~263
- Stattin E, Lindström A (1999). Influence of soil temperature on root freezing tolerance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Soil*, 217: 173~181
- Stefonkus PL, Lanphear FO (1967). Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol*, 42: 1423~1426
- Sturite I, Henriksen TM, Breland TA (2005). Distinguishing between metabolically active and inactive roots by combined staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and image colour analysis. *Plant Soil*, 271: 75~82
- Symeonidou MV, Buckley GP (1999). The effect of pre-planing desiccation stress and root pruning in the physiological condition and subsequent field performance of one year old *Prunus avium* and *P. cerasifera* seedlings. *J Horti Sci Biotech*, 74: 386~394
- Terzioğlu S, Yildiz M, Yucelend M, Oktem HA (2006). High temperature responses of *Aegilops biuncialis* species and *Triticum durum* cultivar. *Pak J Biol Sci*, 9 (14): 2579~2585
- Thusoo S, Gupta S, Sudan R, Kour J, Bhagat S, R Hussain, Bhagat M (2014). Antioxidant activity of essential oil and extracts of *Vale-riana jatamansi* roots. *BioMed Res Int*, doi:10.1155/2014/614187
- Uppalapati SR, Ayoubi P, Weng H, Palmer DA, Mitchell RE, Jones W, Bender CL (2005). The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J*, 42: 201~217
- Weidner M, Brückner H, Pajak E, Schmid B, Wichtmann H (1996). Differential effects of potassium and molybdenum deficiency and fertilization on nitrogen metabolism in Norway spruce (*Picea abies*). *Z Pflanzenernaehr Bodenkd*, 159: 199~206
- Yamauchi T, Watanabe K, Fukazawa A, Mori H, Abe F, Kawaguchi K, Oyanagi A, Nakazono M (2014). Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. *J Exp Bot*, 65 (1): 261~273
- Zhu XB, Cox RM, Arp PA (2000). Effects of xylem cavitation and freezing injury on dieback of yellow birch (*Betula alleghaniensis*) in relation to a simulated winter thaw. *Tree Physiol*, 20: 541~547