

大叶冬青对低温胁迫的生理响应及抗寒性分析

王宁¹, 吴军², 夏鹏云¹, 苏金乐¹

(1 河南农业大学林学院, 河南 郑州 450002; 2 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002)

摘要:通过对不同低温处理下大叶冬青 *Ilex latifolia* 叶片内过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等保护酶活性、叶绿素(Chl)总量、渗透调节物质可溶性糖(SS)、细胞膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量以及相对电导率的测定,探讨大叶冬青对不同低温胁迫的响应特性和耐寒适应能力.结果表明:随着胁迫时间的延长,不同低温处理中叶片相对电导率均呈先升后降又升的变化,且半致死温度(LT₅₀)均在-11℃左右;叶绿素总量在0和-6℃胁迫下先降后略有上升,而-12和-18℃处理中则呈一直下降的变化;SOD和CAT活性及SS含量均呈先升后降的变化,且均以0和-6℃处理中上升较为明显;POD活性呈先降后升的变化,以0和-6℃处理上升明显,而以-12和-18℃处理下降显著;MDA含量整体呈上升变化,但24h内以-18℃处理的上升最为明显.

关键词:大叶冬青;生理响应;抗寒性

中图分类号:S723

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2011)03-0082-05

Physiological Responses of *Ilex latifolia* to Low Temperature and Its Cold Tolerance

WANG Ning¹, WU Jun², XIA Peng-yun¹, SU Jin-le¹

(1 College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The relative electric conductivity (REC), semilethal temperature (LT₅₀) of *Ilex latifolia* under low temperature below 0℃, and SOD, POD, CAT activity, content of MDA, soluble sugar and chlorophyll were investigated. The results showed that as low temperature stress intensified and time prolonged, the REC increased at the beginning then decreased, but increased at last. The LT₅₀ was -11℃ or much lower; The content of chlorophyll decreased at the beginning then increased in 0 and -6℃ treatment, but decreased at all in -12 and -18℃ treatment; The content of soluble sugar and SOD and CAT activities increased at the beginning then decreased, the greatest changes in 0 and -6℃ treatment; POD activity decreased at the beginning then increased; The content of MDA decreased at all, but greatest changes was found in 18℃ treatment within 24 h.

Key words: *Ilex latifolia*; physiological response; cold resistance

低温是限制植物北引的主要环境胁迫因子^[1]. 尽管自然界中有许多在自然分布范围以北依然能生长良好的植物,如火炬松等,但大量研究数据显示低温(尤其是极端低温)依然是影响植物分布范围的直接因素^[2]. 随着全球气候的逐渐变暖,南方树种有望逐渐向北方地区引种. 大叶冬青 *Ilex latifolia* 是冬青

收稿日期:2010-11-18

作者简介:王宁(1979—),男,博士研究生,通信作者;苏金乐(1953—),男,教授,E-mail:Sujinle@163.com

基金项目:河南省科技攻关计划项目(0624070035)

科冬青属常绿阔叶乔木,主要分布于长江中下游地区,树形优美,枝叶浓荫,具有较高的观赏价值和经济价值.对于常绿阔叶树种相对匮乏的北方城市而言,引种驯化大叶冬青的相关研究越来越受到相关部门的重视.因此,了解大叶冬青对低温胁迫的响应特点,并进一步开展其抗寒性评价,具有较高的研究价值和现实意义.目前,有关大叶冬青抗寒性的相关研究较少,谢晓金等^[3]研究了大叶冬青的半致死温度(LT₅₀)随采样时期不同而呈现出的动态变化;田如男等^[4]通过模拟自然低温胁迫,测定大叶冬青的相对电导率,利用 Logistic 方程求得其 LT₅₀.然而,由于植物的抗寒性受多因素调控,因此需从多方面对其进行抗寒性综合评价.为此,本试验通过对不同低温及时间处理中大叶冬青叶片内过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等保护酶活性、叶绿素总量、可溶性糖(SS)、丙二醛(MDA)含量以及相对电导率的测定,探讨各指标间与大叶冬青抗寒性关系,以期了解其对低温的反应特点,为科学评价大叶冬青的抗寒能力提供理论基础.

1 材料与方 法

1.1 试验材料及处理

供试材料为2年生大叶冬青,由南京市祥园苗圃基地提供.2009年3月,移植于河南农业大学林学院试验场(河南,郑州),采用盆栽方式,盆高26 cm,口径21 cm,基质为V(蛭石):V(珍珠岩):V(草炭)=1:1:2,进行正常栽培管理.2009年5月1日开始,将盆栽大叶冬青分别移至不同的 ZPQ-280D 智能气候箱内进行前期培养(温度25℃,光照时间8:00—19:00,光照强度12 000 lx,相对湿度75%~80%).从2009年5月15日开始进行不同低温及时间的处理,设置25(对照)、0、-6、-12和-18℃5种温度,从25℃开始采用每天下降3℃,直至6℃时,稳定3 d;再从6℃降温,每次降温6℃,直至-18℃.各项检测项目设3个重复,降温结束后进行取样检测,每次取3盆植株的第5片叶以上的叶片进行各种分析.

1.2 相对电导率的测定

参考邹琦^[5]的方法,稍有改进.称取打好的小圆片0.5 g放入50 mL的小烧杯中,加入蒸馏水10 mL,用保鲜膜密封好,用DSS-120型电导仪测定3次电导值(E):1 min后震荡摇匀测定 E_0 ;在室温下放

置24 h后,充分摇匀测定 E_1 ;然后,沸水浴中加热15 min,冷却至室温测定 E_2 .按以下公式计算相对电导率:

$$\text{相对电导率} = (E_1 - E_0) / (E_2 - E_0) \times 100\%$$

测定数据用SPSS17.0统计软件进行非线性回归分析,将叶片组织在不同低温处理下的相对电导率随温度的变化用 Logistic 方程 $Y = K / (1 + ae^{-bx})$ 拟合,其中 Y 为低温处理下的相对电导率, x 为处理温度, K 、 a 、 b 为参数.求该方程的二阶导数并令其为0,则可获曲线的拐点 X ,即 $X = \ln a / b$,在此点低温下叶片相对电导率的递增效应最大.此拐点温度作为半致死温度(LT₅₀).

1.3 其他抗寒生理指标的测定

按照文献[6-7],采用蒽酮比色法测定可溶性糖含量,硫代巴比妥酸法测定MDA,氮蓝四唑(NBT)还原法测定SOD,愈创木酚法测定POD,紫外吸收法测定CAT,叶绿素含量采用 φ 为80%的丙酮法测定.

1.4 数据处理

数据分析利用SPSS统计软件进行相关分析和方差分析.

2 结果与分析

2.1 不同低温胁迫过程中大叶冬青相对电导率及其半致死温度的变化

从图1中看出,随着胁迫时间的延长,不同低温处理下大叶冬青的相对电导率均呈先升后降又升的变化.至72 h,与对照相比,-12和-18℃处理的相对电导率增加了62.56%和89.13%,而0和-6℃处理的变化不明显,说明-6℃以上低温对大叶冬青影响较小.

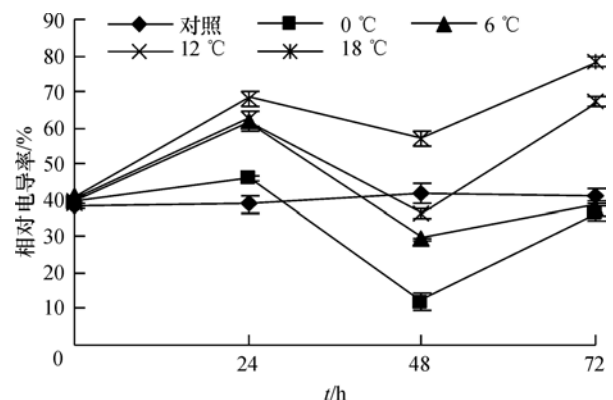


图1 低温处理后大叶冬青的相对电导率变化

Fig. 1 Changes of relative electric conductivity in *Ilex latifolia* leaf under low temperature

用 Logistic 曲线拟合求出的拐点温度(即 LT_{50}) 列于表 1. 拐点温度值越低,表明其 LT_{50} 越低,即该树种抗寒性越强^[8]. 表 1 中的 R^2 为相关指数,是方程拟合度的度量,它的取值在 $[0, 1]$, R^2 越大,说明回归方程拟合数据越好. 表 1 表明不同处理时间低温胁迫下,大叶冬青的 LT_{50} 均在 $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,且随胁迫时间的延长, LT_{50} 也逐渐降低.

表 1 不同处理时间大叶冬青半致死温度 (LT_{50}) 的计算

Tab.1 The LT_{50} of *Ilex latifolia* leaf of different periods

$t_{\text{处理}}/h$	Logistic 方程 ¹⁾	$LT_{50}/^{\circ}\text{C}$	拟合度 (R^2)
24	$Y=58.436/(1+165.277 e^{0.461 x})$	-11.08	0.986
48	$Y=57.465/(1+69.868 e^{0.378 x})$	-11.23	0.997
72	$Y=61.247/(1+103.867 e^{0.360 x})$	-12.90	0.973

1) Y 为低温处理下的相对电导率, X 为处理温度.

2.2 不同低温胁迫过程中大叶冬青抗寒生理生化指标的变化

2.2.1 叶绿素总量的变化 大叶冬青叶片内叶绿

素总量在 0 和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理中呈先降后升,而 -12 和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理中则呈一直下降变化(图 2a). 24 h 内叶绿素总量始终处于下降趋势,至 48 h, 0 和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 叶绿素总量开始回升. 这可能是大叶冬青为了维持正常的光合作用主动适应低温环境的结果. 当低温胁迫超过了植物的承受范围,叶绿素含量出现一直减少的变化.

2.2.2 SOD、POD 及 CAT 活性的变化

SOD 活性在 0 和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理中呈先升后降又升, -12 和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理中则呈先升后降的变化(图 2b). 至 72 h, -12 和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理的 SOD 活性与胁迫 24 h 相比,分别下降 85.95% 和 87.39%; 与对照相比, 0、 -6 、 -12 和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理的 SOD 活性分别下降 20.59%、30.59%、80.0% 和 82.94%. 表明在短时间内大叶冬青通过调节 SOD 活性来增加其抗寒性,但随着胁迫的进一步加剧,其自身调节能力减弱,从而导致低温胁迫伤害.

随着胁迫时间的延长, 0 和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理的 POD 活性呈先降后升(图 2c), 并分别在胁迫至 48 和 24 h 出

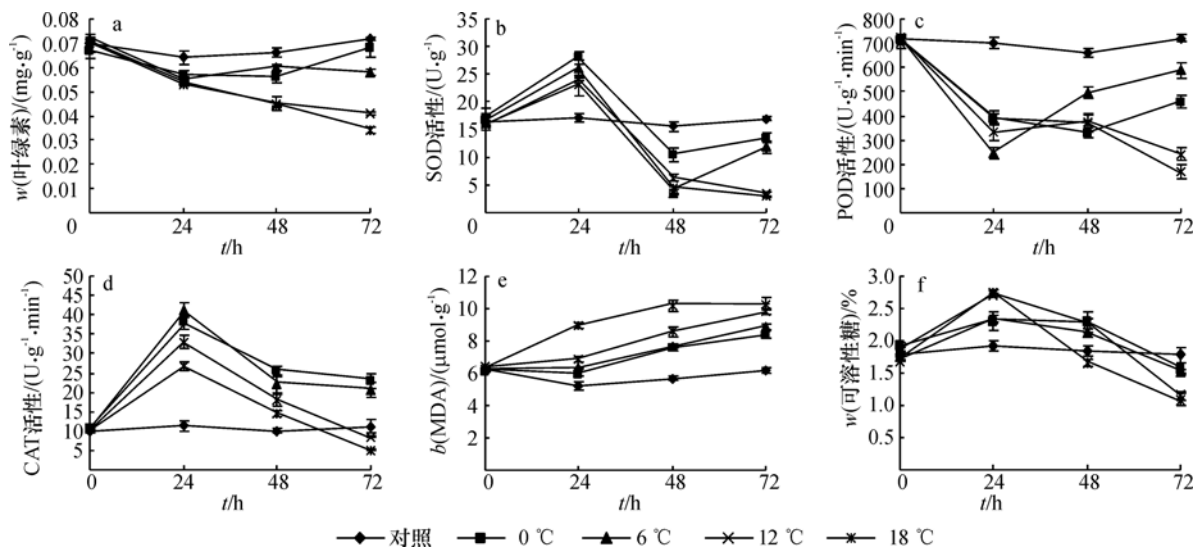


图 2 不同低温处理下大叶冬青叶片中各项生理指标的变化

Fig. 2 Changes of physiological response in *Ilex latifolia* leaf under low temperature

现最低值,分别比处理前降低 53.66% 和 65.92%. 与对照相比,胁迫至 48 和 72 h, POD 活性均以 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理为最高, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理为最低. 由此说明,短时间和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的胁迫,大叶冬青可维持一定的 POD 活性,随胁迫时间延长和温度的降低,其活性也随之下降.

CAT 活性呈先升后降变化(图 2d), 上升阶段以 0 和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理较明显,而下降阶段以 -12 和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理明显. 至 48 h, 各低温处理 CAT 活性依然均高于对照,至 72 h, -12 及 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理低于对照. 上述结果表

明,短时间和 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的胁迫,大叶冬青叶片通过提高 CAT 活性来提高其抗寒性,随着胁迫时间的延长和温度的降低,其活性也随之下降,导致低温胁迫伤害.

2.2.3 MDA 及可溶性糖含量变化

不同低温处理的 MDA 含量均呈上升变化(图 2e), 24 h 内以 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理最为明显. 胁迫至 72 h, 0、 -6 、 -12 和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理的 MDA 含量分别比处理前增加了 36.54%、39.84%、52.25% 和 63.59%; 而与对照相比,分别增加了 35.44%、43.69%、58.90% 和 66.50%. 由此表明,

随着温度的降低和胁迫时间的延长, -18 ℃处理对大叶冬青的伤害较大,而 -12 ℃处理次之。

可溶性糖含量呈先升后降趋势(图 2f),其中 0 和 -6 ℃处理中的下降在 48 h 后,而 -12 和 -18 ℃处理的下降则出现在 24 h 后。至 48 h, 0、-6 及 -12 ℃处理的可溶性糖含量高出处理前 18.65%、20.45% 和 34.52%,而 -18 ℃处理比处理前低 9.34%。与对照相比,至 48 h, 0、-6 及 -12 ℃处理可溶性糖含量分别增加了 23.78%、14.59% 和 22.16%,而 -18 ℃处理则降低了 10.81%。这表明短期低温胁迫,大叶冬青通过积累可溶性糖来增强自身抗寒能力,但随着胁迫时间延长和温度的降低,持续低温对其造成了伤害。

2.3 不同低温胁迫过程中大叶冬青各项抗寒生理指标的相关性分析

从表 2 看出,Chl 与 MDA 之间均呈负相关或显著负相关,胁迫至 24 h, Chl 与 SS、POD 呈显著正相

表 2 不同低温胁迫下大叶冬青叶片各项指标的相关性分析¹⁾

Tab.2 Correlation analysis of the indicators in *Ilex latifolia* under low temperature stress

$t_{\text{处理}}/$ h	指标	Chl 总量	MDA	可溶性 糖(SS)	膜透性 (MP)	SOD	POD
24	MDA	-0.819					
	SS	0.929*	-0.844				
	MP	-0.922*	0.905*	0.896*			
	SOD	0.680	0.232	0.441	0.382		
	POD	0.903*	-0.643	-0.680	-0.792	-0.831*	
	CAT	-0.718	0.257	0.452	0.491	0.961**	-0.896*
48	MDA	-0.893*					
	SS	0.902*	-0.436				
	MP	-0.336	0.616	-0.858			
	SOD	0.615	-0.792	-0.033	-0.175		
	POD	0.783	-0.753	-0.342	0.232	0.552	
	CAT	-0.518	0.264	0.743	-0.704	-0.572	-0.647
72	MDA	-0.898*					
	SS	0.976**	-0.938*				
	MP	-0.931*	0.715	-0.904*			
	SOD	0.984**	0.922*	0.996**	-0.912*		
	POD	0.904*	-0.902*	0.970*	-0.873	0.948*	
	CAT	0.676	-0.287	0.574	-0.853	0.614	0.497

1) * 表示在 0.05 水平上显著相关, ** 表示在 0.01 水平上显著相关。

关,与膜透性(MP)呈显著负相关,MP 与 MDA、SS 之间呈极显著正相关,POD 与 SOD、CAT 之间呈显著相关,SOD 与 CAT 之间极显著正相关。在低温胁迫下,膜脂过氧化的加剧,致使植物渗透调节物质合成速度减小,渗透调节能力降低,Chl 含量下降,致使植物生成机制遭到破坏。

至 48 h,MDA 与 SS、SOD、POD 负相关,与 MP 和 CAT 正相关,说明在这个过程中 SS、SOD、POD 的协同作用有效地保护了 MDA 对大叶冬青细胞膜的伤害。至 72 h,MDA 与 MP、SOD 正相关,与 SS、POD、CAT 负相关,说明 SS、POD、CAT 在这个过程中起着重要的作用。表明在整个低温胁迫过程中,这些物质都不能有效清除 MDA 对细胞膜的伤害,不同物质在不同阶段对 MDA 直接清除作用是不同的。

3 讨论与结论

3.1 不同低温处理中 MDA 含量及相对电导率与大叶冬青的抗寒性

低温条件下植物体内超常积累活性氧自由基,引起膜脂过氧化导致冷伤害^[9],此伤害最明显的变化之一就是积累了大量的膜脂过氧化产物 MDA。因而 MDA 的产生量成了鉴别和了解低温胁迫对生物膜危害程度的重要指标之一。本试验中,24 h 内以 -18 ℃处理 MDA 含量增加最为明显,而其他 3 种温度处理不明显,说明此时间大叶冬青通过自身调节来适应 -12 ℃低温的胁迫,从而减少对其造成低温伤害。

电解质的外渗则导致了电导率的加大^[10]。本试验中相对电导率随胁迫时间延长呈现先升后降再升的变化。胁迫至 72 h,与对照相比,-6 ℃处理的电导率变化不明显,说明在 -6 ℃低温下胁迫 72 h 并未对大叶冬青叶片造成伤害。LT₅₀ 均在 -11℃左右,说明大叶冬青具有一定抗寒性,这与前人研究结果^[5]相似。

3.2 不同低温处理中保护酶活性与大叶冬青的抗寒性

许多研究表明 SOD、CAT 的活性与植物抗逆性有关系,在适度逆境诱导下 SOD、CAT 的活性增加以提高植物适应力^[11]。在强度胁迫试验中,酶活性一般随胁迫增加而增加,或者是先增加后降低的基本势态^[12]。本研究表明,不同温度降幅下 SOD、CAT 活性变化属于后者。在一定的低温范围内,大叶冬青通过

酶活性的增加提高适应低温胁迫的能力. 但当胁迫超过其忍受范围, 保护酶活性不再增加反而下降, 说明其忍受低温的能力是有限的. 与 0 和 -6°C 处理相比, -18°C 处理中酶活性下降最为明显, -12°C 处理次之, 说明 -18°C 超过了大叶冬青的忍受范围, 而 -6°C 低温对其造成的影响较小.

3.3 不同低温处理中可溶性糖含量、叶绿素总量与大叶冬青的抗寒性

低温条件下, 植物通过体内各种渗透调节物质的积累, 维持细胞内外的渗透平衡, 从而提高植物的抗寒能力^[13]. 可溶性糖作为植物体内重要的渗透调节物质, 其含量变化与植物的抗寒性必然密切相关. 本研究中, 0 和 -6°C 处理中, 可溶性糖的下降出现在 48 h 后, 且下降幅度较小, 说明大叶冬青通过渗透调节物质的增加能够适应此低温胁迫. 而 4 种低温处理中, 以 -18°C 处理中在 24 h 后的下降最为明显, 说明此条件超过其能忍受低温的范围.

常绿阔叶植物在越冬期间叶绿体形态结构发生明显变化, 叶绿体数目较少, 叶绿素含量降低^[14]. 本试验中, 0 和 -6°C 处理中叶绿素总量先下降后上升的变化, 说明大叶冬青通过自身调节能够完全适应 -6°C 以上的低温胁迫.

相关性分析结果表明, 各项抗寒指标间存在较好的相关性, 但由于植物的抗寒性受多因素调控, 因此对其抗寒性评价也需要是多方面的, 采用多种方法相互加以印证, 才能得到更加完善的结论.

参考文献:

- [1] STUSHNOFF C, JUNTILA O. Seasonal development of cold stress resistance in several plant species at a coastal and a continental location in North Norway[J]. *Polar Biology*, 1986, 15: 129-133.
- [2] PARKER J S. Cold resistance in woody plants[J]. *The Botanical Review*, 1963, (2): 123-201.
- [3] 谢晓金, 郝日明. 南京地区 12 种常绿阔叶树种冬季抗寒性动态变化[J]. *生态学报*, 2009, 29(4): 2149-2154.
- [4] 田如男, 薛建辉. 6 个常绿阔叶乔木树种抗寒性研究[J]. *西南林学院学报*, 2005, 25(4): 110-113.
- [5] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [7] 潘东明, 李合生. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [8] 田如男, 薛建辉, 李晓储, 等. 深山含笑和乐昌含笑的抗寒性研究[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2004, 28(6): 55-57.
- [9] WISE R R, NAYLOR A W. Chilling-enhanced photooxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants[J]. *Plant Physiol*, 1987, 83: 278-282.
- [10] LYONS J M. Chilling injury in plants[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1973 (24): 445-466.
- [11] 张文辉, 段宝利, 周建云, 等. 不同种源栓皮栎幼苗叶片水分关系和保护酶活性对干旱胁迫的响应[J]. *植物生态学报*, 2004, 28(4): 483-490.
- [12] 任安芝, 高玉葆, 刘爽. 青菜幼苗体内几种保护酶的活性对 Pb、Cd、Cr 胁迫的反应研究[J]. *应用生态学报*, 2002, 13: 510-512.
- [13] 艾希珍, 于贤昌, 王绍辉, 等. 低温胁迫下黄瓜嫁接苗与自根苗某些物质含量的变化[J]. *植物生理学通讯*, 1999, (1): 26-28.
- [14] 董丽, 贾桂霞, 苏雪痕. 常绿阔叶植物越冬期间叶片组织结构的适应性变化[J]. *园艺学报*, 2005, 30(1): 49-64.

【责任编辑 李晓卉】