

香木莲对短时低温胁迫处理的生理生态响应

黎明¹, 李福秀², 马焕成², 李伟¹, 王林忠³

(1. 中国科学院武汉植物园水生植物生物学实验室, 湖北武汉 430074

2. 云南省西南林学院, 昆明 650224; 3. 四川省绵阳师范学院, 绵阳 621000)

摘要: 通过测定木兰科植物香木莲在人为短时低温处理下的一些生理生化指标的变化情况, 可以分析香木莲苗木的抗性生理情况, 以期对香木莲的抗寒性进行评价。实验结果表明, 香木莲的叶片在经短时低温处理后, 其脯氨酸含量、丙二醛含量及相对电导率均表现为不同程度的上升。而叶片的叶绿素荧光指数的变化则表现为随处理时间的延长, 叶片的原初荧光(F_0)上升, 其光化学效率(F_v/F_m)及可变荧光/原初荧光比率(F_v/F_0)则表现为随处理时间的延长而降低。这表明, 短时低温处理对叶片的叶绿体光系统的潜在活性及量子传递效率造成了一定的影响, 结合生理生化指标的变化, 可以部分解释香木莲抗寒机制。

关键词: 低温; 脯氨酸; 丙二醛; 叶绿素荧光; 相对电导率

中图分类号: S686 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)01-0037-03

香木莲(*Manglietia aromatica*)别称拟小莲, 常绿乔木, 树高 25 m(米), 胸径 50 cm(厘米)。主要分布于云南金平、麻栗坡、马关、西畴、富宁、广南、广西的龙州、那坡、百色等地。分布纬度为 $22^{\circ}40' \sim 24^{\circ}N$, $103^{\circ} \sim 107^{\circ}E$ 之间。在广西分布海拔为 400 m~1 000 m(米); 在云南地区海拔 1 300 m~1 600 m(米), 该植株全株都有香味, 故名香木莲, 是国家二级重点保护树种。香木莲枝、叶、花及木材都可提取香油, 调制香料用, 同时, 由于树形优美, 是良好庭园绿化树种^[1]。目前, 国内外关于香木莲的相关报道较少。同时由于香木莲分布较狭窄, 种源较少, 因此香木莲的保护引起了科研工作者的广泛关注。研究香木莲在低温下的生理生化反应, 有助于加强对香木莲种质资源的保护和利用。同时, 也可以为香木莲的引种工作提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为香木莲一年生苗, 香木莲幼苗为扦插所得^[2]。试验于 2003 年 11 月进行, 月均温度为 $14.3^{\circ}C$, 相对湿度为 40%。苗木露天栽植, 每天傍晚时浇水, 以保持苗木水分供应充足。

1.2 试验方法

取香木莲苗木的上部 3、4 片功能叶作为测定材料, 置烧杯(200 ml(毫升))中, 烧杯中添加少量蒸馏水, 将叶柄浸于液面下, 保证叶片水分供应正常。在冰箱中($2^{\circ}C$, 无光)进行零上低温处理。低温胁迫时间分别为 0 h、4 h、8 h 和 12 h(小时)。测定香木莲在零上低温胁迫下的叶绿素荧光指标、电导率、脯氨酸、丙二醛及可溶性糖含量的变化。

1.3 测定指标

叶绿素荧光的变化: 通过植物效能计(PEA, UK)测定不同处理时间香木莲的原初荧光 F_0 、最大荧光 F_m 、光化学效率 F_v/F_m 、及可变荧光/原初荧光比率 F_v/F_0 。

电导率的测定: 将叶片用去离子水冲洗 3 次, 用打孔器($R = 0.6$ mm(毫米))对叶片打孔, 置 20 ml(毫升)小烧杯中, 加去离子水 15 ml(毫升), 真空抽气 15 min(分钟), 4 h(小时)后用 电导率仪(Senion 5, USA)测定其电导率, 然后在沸水浴中将材料组织杀死, 再次测定电导率, 计算相对电导率^[3]。

脯氨酸含量: 参照刘祖祺等方法测定。用茚三酮比色法于 722B 型分光光度计(515 nm)下比色测定^[4]。

可溶性糖含量: 用蒽酮比色法测定。于 722B 型分光光度计(620 nm)下比色测定^[3]。

丙二醛(MDA)含量: 丙二醛(MDA)按林植芳等(1984)方法进行。取样品提取液 1.5 mL(毫升), 加 2.5 mL(毫升)TBA 显色液, 混匀后于 10 000 r(转)/min(分钟)下离心 15 min(分钟), 以缓冲液代替酶液作为对照。所提取的上清液在 534 nm 及 600 nm(纳米)波长下比色。丙二醛含量用每克鲜重样品中丙二醛微摩尔浓度表示^[6]。上述试验均重复 3 次。

1.4 试验数据分析

采用 SPSS 统计分析软件, 采用 ANOVA 单方差分析中 Duncan 法分析不同处理时间的差异显著性。

2 试验结果及分析

2.1 叶绿素荧光的变化

叶绿素荧光分析技术是近几年来用于分析植物内在光合特性的一种分析技术。它广泛用于植物在胁迫状态下的叶绿素荧光的变化情况, 通过叶绿素荧光的一些特征的变化, 可以分析植物的抗逆性强弱。

如图 1 所示, 随胁迫程度的增加, F_0 上升, F_v/F_0 和 F_v/F_m 下降。 F_0 的上升反映了 PSII 反应中心失活程度, 低温胁迫可能对植物的光反应中心造成不可逆转的伤害。而 F_v/F_0 和 F_v/F_m 降低则反映出 PSII 的潜在活性和原初光能转换效率的变化, 均随胁迫时间的延长而降低。光化学效率 F_v/F_m 在 0 h~4 h(小时)之间变化显著($P < 0.05$), 在随后的处理中变化不显著。 F_v/F_0 的变化趋势与光化学效率的变化趋势相仿。在测定的叶绿素荧光指数中, 最大荧光的变化规律性不明显。经比较, 原初荧光的变化各处理之间没有显著差异。而最大荧光、光化学效率及 F_v/F_0 比率处理与对照之间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 生理生化指标对低温胁迫的响应

* 基金项目: 中国科学院创新工程重要方向资助项目(KSCX2-1-10)、中国科学院武汉植物园所长基金资助项目。云南省省级重点建设学科, 西南林学院森林培育学科基金资助。
收稿日期: 2005-09-22

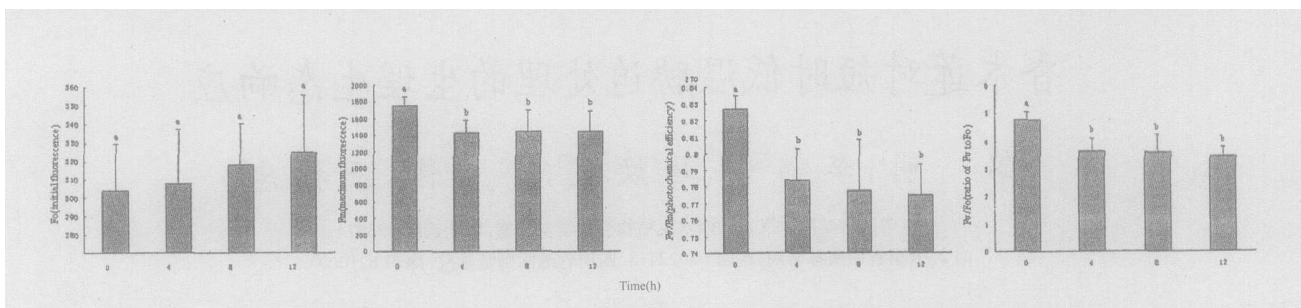


图1 低温处理下香木莲叶片的叶绿素荧光变化情况(图中误差线为标准误)

低温对香木莲叶片脯氨酸、可溶性糖及丙二醛含量的影响表

处理 (h)	相对电导率 (%)	脯氨酸 (mg·g ⁻¹ FW)	可溶性糖 (mg·g ⁻¹ FW)	丙二醛 (μmol·g ⁻¹ FW)
0	24.72a	5.33±0.31a	3.34±0.33a	2.372±0.04a
4	36.94b (49.41)	15.93±1.30b (198.87)	6.59±0.17b (97.16)	3.182±0.294b (34.15)
8	41.56b (68.11)	21.70±3.04c (307.13)	11.31±0.56c (238.60)	4.706±0.189c (98.40)
12	44.01c (77.99)	30.65±0.24d (475.05)	16.50±0.55d (393.94)	4.745±0.100c (100.04)

注:表中数据除相对电导率外,均为 mean±SE,表中不同字母代表差异显著 P<0.05。括号内数据为各生理生化指标相对对照的变化率(%)。

如表中所示,随低温处理时间的增加,香木莲叶片的相对电导率、脯氨酸含量、可溶性糖含量及丙二醛含量均呈现上升的趋势。且差异均为显著(P<0.05)。在低温胁迫下,香木莲叶片内游离脯氨酸含量、可溶性糖及丙二醛含量均增高。其提高的趋势与低温胁迫时间呈正相关。经分析,各生理生化指标的变化与胁迫程度的大小的相关系数分别为:相对电导率:0.941、脯氨酸:0.994^{*}、可溶性糖:0.995^{*}、丙二醛:0.952^{*}。其中,脯氨酸含量、可溶性糖含量的相关性均达到极显著水平(P<0.01)。

3 结论与讨论

叶绿素荧光的变化是用于分析植物对外界胁迫的生理生态变化的重要分析技术。本试验中,原初荧光(F₀)的变化不显著(图1)。由于原初荧光的变化代表了植物光合活性中心伤害情况,因此,其变化不显著在一定程度上反映出香木莲对短时低温具有一定的抗性。光化学效率(F_v/F_m)及 F_v/F₀ 比率分别代表了植物光系统的量子传递效率及光系统的潜在活性,其中光化学效率(F_v/F_m)在胁迫条件下变化显著,表明,短时低温胁迫可能造成香木莲叶片光合结构的光抑制^[7]。因此,光化学效率及 F_v/F₀ 比率的下降表明了低温胁迫对香木莲叶片的光系统量子传递效率及光系统的潜在活性均能造成一定的影响,其中以量子传递效率所受影响较大。这与张教林等人对两种热带树种幼苗低温处理后得到的实验结果相似^[9]。

低温胁迫会使生物膜透性增大,使植物受到伤害^[8]。试验中,以香木莲叶片为材料进行的暗低温胁迫试验也表现出了这样的变化趋势。随胁迫时间的延长,细胞膜透性增加。在 2℃低温胁迫下经 4 h~12 h(小时),其电导率相比 CK 增加了 49.41%~77.99%(表)。说明短时低温胁迫对膜透性的影响较小,这也与原初荧光(F₀)的变化相似。电导率升高的原因,简单地说是低温导致植物细胞收缩及质膜发生相变,使膜脂从液态转变成凝胶态,膜收缩不均匀出现裂隙或孔道,致使离子外渗。按照自由基理论在逆境条件下植物体内产生过多的自由基,首先伤害膜系统。膜的拟脂双分子层中含有不饱和

脂肪酸,其不饱和键容易被过氧化分解,造成细胞膜的破坏,表现出膜透性增大和离子泄漏。

水分胁迫可以诱导植物体内游离脯氨酸的积累是一个普遍现象。低温胁迫下植物体内也会积累脯氨酸,香木莲叶片在 2℃低温胁迫下经 4 h~12 h(小时),脯氨酸含量比对照高 198.87%~475.05%(表)。逆境条件下游离脯氨酸积累有多方面的生理作用,在所有氨基酸中,高浓度脯氨酸对细胞生长的抑制作用最低,脯氨酸等电点近中性(pH 6.5),大量积累不会引起组织中 pH 值的急剧变化;脯氨酸溶解度大,可提高组织保水力,脯氨酸也可作为过剩能量和氮素的贮存库和解氨毒、以及氮素和能量的供应库,同时,脯氨酸对淀粉酶和糖代谢过程中的己糖激酶、苹果酸脱氢酶等多种酶的热失活也起保护作用。

植物叶片在胁迫环境条件下,可溶性糖的含量会表现出一定的变化。已有相关研究表明,植物体内可溶性糖的含量与植物的抗寒性呈正相关^[10]。在本实验中,可溶性糖的含量随胁迫时间的延长表现出增加的趋势。而且变化趋势显著(P<0.05)。其增加的幅度在 97.16%~393.94%之间(表)。说明了在胁迫条件下,香木莲叶片随胁迫时间的增加表现出可溶性糖含量的增加。因此,可溶性糖含量可以在一定程度上反映出植物抗寒性的强弱。

香木莲叶片在零上低温逆境胁迫下,细胞膜系统结构出现了一定的损伤,叶细胞膜透性加大是其最终表现和证据。经低温胁迫后,产生的 O₂⁻以及由此产生的 H₂O₂、OH⁻等自由基和活性氧,会氧化膜结构中不饱和脂肪酸的双键,使之断裂、分解而破坏。这种由 O⁻²引发的脂质过氧化表现在膜结构上即为膜脂过氧化,最终产物为 MDA^[11]。MDA 是具有细胞毒性的物质,它能与膜结构上的蛋白质和酶结合、交联而使之失去活性,就进一步地破坏了膜结构^[9]。本研究的实验结果证实经低温胁迫的香木莲叶细胞内产生过剩 O₂⁻,由之诱发膜脂过氧化而产生 MDA。

参考文献:

- [1] 叶桂艳. 中国木兰科树种[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] 李福秀, 黎明. 香木莲扦插繁殖初报[J]. 西南林学院学报, 2003, 23(2): 9~12.
- [3] 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.
- [4] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸的方法[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(4): 62~65.
- [5] 林植芳. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 605~619.
- [6] 张教林, 曹坤芳. 夜间低温对 2 种热带雨林树种幼苗叶绿素荧光的影响[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(4): 356~360.
- [7] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide.

Journal of Experimental Botany, 2000 51: 659~68

[8] 王荣富. 植物抗寒指标的种类及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1987, (3): 49~55.

[9] 范月仙, 李生泉, 冯文新. 棉苗抗冷性与其可溶性糖含量变化关系的研究[J]. 棉花学报, 1995 7(2): 126~127.

[10] 王建华, 刘鸿先, 徐同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1989, (1): 1~7.

[11] Hanyadi. P. Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Calypso) seedlings. Plant physiology. 1993 141, 733~738.

Ecophysiological Response of *Manglietia aromatica* to Short-term Low Temperature Treatment

LI Ming¹, LI Fuxiu², MA Huancheng², LI Wei¹, WANG Linzhong³

(1. The Laboratory of Aquatic Plant Biology Wuhan Botanical Garden Chinese Academy of Sciences Wuhan Hubei 430074;

2. Southwest Forestry College Kunming Yunan 650224; 3. Mianyang Normal College Mianyang Sichuan 621000)

Abstract: The variation of the physiological indices at low temperature of the *Manglietia aromatica* leaves have been measured in this experiment. The results indicate that the concentration of the free Proline, the malondialdehyde(MDA), soluble sugar and the relative electrical conductivity in leaves increased with the extended time of treatment. Among the chlorophyll fluorescence Parameters(Fv/Fm) and the variable fluorescence/ initial fluorescence ratio(Fv/Fo) decreased which could be explained by the influence of the low temperature on photosystem II(PSII). In leaves of *Manglietia aromatica*, the maximum quantum efficiency of PSII primary photochemistry(Fv/Fm) was significantly affected after 4h exposure to the low temperature of 2 °C. The results could be used as the criterion for evaluation of the mechanism of winter resistance of *Manglietia aromatica*.

Key Words: Low temperature, Free Proline, Malondialdehyde(MDA), Chlorophyll fluorescence, Electrical conductivity

几种农家小菜的腌制

司玉芹

蜜汁蒜: 配方: 蒜头 50 kg、白糖 20 kg、醋 15 kg、食盐 0.3 kg、桂花 1 kg(公斤)。加工方法: 大蒜扒皮、去须后、入缸用清水浸泡第 2 d(天)换水, 第 3 d(天)捞出控干, 然后将煮好的配料汤晾凉, 倒入蒜缸内浸渍。隔 2 d(天)倒一次缸, 倒 13 次缸后封缸。3 月后即成品。

盘香萝卜: 配方: 咸萝卜 1.50 kg(公斤)、二级酱油 12 kg(公斤), 5 度食醋 3.5 kg(公斤), 鲜辣椒 1.5 kg; (或干辣椒 0.8 kg(公斤)), 糖精 7.5 g(克)。加工方法: 将咸青萝卜整理洗净后, 切成条形, 放入清水中浸泡 10 h(小时)后, 榨压出 30% 的水分, 然后浸于配好辅料的酱油内, 每天倒两次缸, 2 d(天)后即成品。

酱黄瓜: 配方: 咸黄瓜 50 kg、甜面酱 35 kg(公斤)。加工方法: 先将咸黄瓜放入清水中浸泡脱盐, 夏季浸泡 10 h(小时), 冬季浸泡 14 h(小时), 浸后捞出控去水分, 用面酱泡制 4 d(天), 每天打耙两次。而后捞出控去水分, 再放甜面酱于缸内, 15 d(天)后即成品。

酱茄子: 配方: 圆茄子 50 kg、甜面酱 35 kg(公斤)。加工方法: 掰掉圆茄的蒂; 把把、放入水中用新砖沾水磨去老皮, 但不露籽。磨后用木杆或竹杆打 4 个穿透的孔。而后放入 25 度盐水中浸泡 4 d~5 d(天), 浸后捞出控干, 放入酱缸内, 每天打耙两次, 15 d(天)后即成品。

蜜酱胡萝卜: 将胡萝卜去根须, 洗净切成小块待用。每 5 kg(公斤)萝卜用水 4 kg(公斤), 酱油 3 kg(公斤)、醋 50 g(克)。水、酱油、醋一起入锅烧开放入胡萝卜煮 5 min~10 min(分钟)后出锅。待冷透后倒入容器内, 加红糖 500 g(克), 蜂蜜 250 g(克), 搅拌均匀, 封口, 放置阴凉处, 1 个月后即成。

酱油青椒: 配方: 咸青椒皮 50 kg、二级酱油 12.5 kg、酱油 7.5 kg(公斤), 苯甲酸钠 2.5 g(克)。加工方法: 青椒去籽后切成 2 cm(厘米)的块, 用清水浸泡沏盐 10 h(小时)后, 捞出控干, 放入配好辅料的酱油中浸渍 3 d(天), 每天倒一次缸, 即为成品。

酱茼蒿: 配方: 咸茼蒿 50 kg、甜面酱 30 kg(公斤)。加工方法: 将咸茼蒿整理后入清水浸泡 12 h(小时)。浸后捞出控水 5 h~6 h(小时), 再放入面酱缸内, 每天打耙两次。15 d(天)后即成品。

酱姜片: 配方: 咸洋姜 50 kg、甜面酱 40 kg(公斤)。加工方法: 将咸洋姜片切成 3 mm(毫米)厚的片, 用清水浸泡 12 h(小时)后捞出控去水分, 放入次面酱缸内, 每天打耙两次, 泡制 4 d~5 d(天)后捞出放入甜面酱缸内, 每天打耙两次。15 d(天)后即成品。

酱什锦: 配方: 咸苤蓝 22.5 kg、咸黄瓜 12.5 kg(公斤), 咸胡萝卜 2.5 kg(公斤), 二级酱油 5 kg(公斤), 味精 50 g(克), 糖精 7.5 g(克)。加工方法: 将咸苤蓝洗净, 其中 10 kg(公斤)切成 25 cm 长, 1 cm 宽, 3 cm(厘米)厚的长方形锯齿, 另 12.5 kg(公斤)切成 3 cm 长, 1 cm 宽、0.3 cm(厘米)厚的四边形状块。咸黄瓜破半去籽后, 切成 4 cm 长, 0.6 cm(厘米)宽的粗条。咸胡萝卜切成 2 cm 长、0.6 cm 宽、0.2 cm(厘米)厚的长方体、咸虹豆角切成 3 cm(厘米)长的段, 咸姜切成细丝, 花生米煮成七成熟后去皮, 然后将上述切成的咸菜一并倒入清水浸泡沏盐。10 h(小时)后, 捞出压榨, 压出 30% 的水分, 加入花生米, 放入配好辅料的酱油中浸泡 3 d~4 d(天), 每天倒 1 次缸, 一周后为成品。

酱油藕片: 配方: 鲜藕 50 kg, 食盐 2.5 kg、酱油 30 kg(公斤), 味精 50 g, 糖精 50 g(克)。加工方法: 选取用整个的鲜藕。用清水洗净后切成 3 cm(厘米)厚的片, 放入沸水焯透后, 捞出随即倒入缸中, 加盐拌匀, 然后将配好辅料的酱倒入浸渍, 当天倒缸 1 次, 第 2 天再倒 1 次缸, 4 d~5 d(天)即为成品。

(山东省济宁市任城区农业局, 272133)