

大叶铁线莲对低温胁迫的响应

马 迪, 岳 桦

(东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 研究了大叶铁线莲在人工模拟低温胁迫下根系 细胞膜透性、SOD 活性、可溶性蛋白含量、丙二醛含量和脯氨酸含量的变化, 以探求其抗寒性。结果表明: 在低温胁迫下大叶铁线莲细胞膜透性明显增加, 呈“S”形曲线; SOD 活性、可溶性蛋白含量、丙二醛含量先上升再下降, 脯氨酸含量呈下降变化规律; 通过相关性研究, 相对电导率、可溶性蛋白含量和脯氨酸含量可作为评价其抗寒性的评价因子; 配合 Logistic 方程得到 LT50 低于哈尔滨历史极限最低温度。

关键词: 大叶铁线莲; 低温胁迫; 细胞质膜透性; SOD 活性; 可溶性蛋白; 丙二醛; 脯氨酸

中图分类号: S 682.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0112-03

大叶铁线莲 (*Clematis heraclei folia*) 为毛茛科铁线莲属落叶直立灌木, 其原始自然分布地区涵盖全国 14 个省, 最南端为云南省, 最北端为吉林省。哈尔滨位于吉林省以北, 北纬 $44^{\circ}04' \sim 46^{\circ}40'$, 东经 $125^{\circ}42' \sim 130^{\circ}10'$ 之间, 冬季 210 d 集中降雪期为 11 月至翌年 1 月, 1 月的月平均气温为 $-20.3^{\circ}\text{C}^{[1-2]}$, 日极端最低气温为 -42.6°C , 年极端最多降水量为 1 081.3 mm, 年极端最少降水量为 247 mm, 极端最大风速为 37.0 m/s。为丰富哈尔滨植物景观。现对大叶铁线莲进行抗寒性研究, 希望通过测定人工模拟低温 ($0 \sim -40^{\circ}\text{C}$ 极端低温) 后大叶铁线莲植株细胞膜透性、SOD 活性、可溶性蛋白、丙二醛 (MDA) 和脯氨酸含量, 分析其与抗寒性的关系, 为大叶铁线莲在哈尔滨地区及其哈尔滨以北地区绿化应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验地位于黑龙江哈尔滨市东北林业大学实验林场的苗圃内。选用 2008 年播种大叶铁线莲实生苗为供试材料设为 A 组, 以丹东 4 a 生大叶铁线莲已引种到哈尔滨 1 a 的植株为试材设为 B 组。于 2008 年 10 月至 2009 年 3 月期间进行人工模拟低温胁迫研究。

1.2 试验方法

2008 年 10 月选取长势一致, 健康无病虫害且具有越冬芽的大叶铁线莲试验苗移入实验室, 用自来水将供试材料根系清洗干净, 再用去离子水清洗根系 2 遍, 擦

干后用纱布包好, 进行预冷降温处理 (4°C 即 CK), 经过预冷后进行人工模拟低温处理。人工模拟低温处理时 0°C 为起始温度, 以 $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ 速度降温, 达到处理温度后维持 12 h。选取大叶铁线莲的主根若干测定细胞膜透性、SOD 活性、可溶性蛋白含量、丙二醛含量及脯氨酸含量。

电导率采用电导仪测定; 氮蓝四唑 (NBT) 法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力^[3]; 可溶性蛋白质含量测定参照 Bradford 的考马斯亮蓝法; 丙二醛 (MDA) 参照邹琦方法测定; 脯氨酸采用张殿忠等的磺基水杨酸提取, 酸性茚三酮显色。上述试验均重复 3 次, 每次重复量为 3。

2 结果与分析

A、B 2 组大叶铁成莲在人工不同低温胁迫后, 其相对电导率、SOD、可溶性蛋白质、MDA、脯氨酸差异见表 1、表 2 其各因子的相关性见表 3、4。

2.1 细胞质膜透性对不同低温胁迫的响应

大叶铁线莲相对电导率与处理温度之间的关系呈现出急剧 (B 组) 或缓慢 (A 组) 上升的“S”形曲线。随着处理温度的下降, 在 -20°C 时出现明显拐点, 拐点以前, 外渗率不断增加, 表明降温对细胞膜伤害率的递增效应不断增大, 到拐点时最大; 拐点之后, 外渗率逐渐下降, 表明降温对细胞膜伤害率的递增效应减小。配合 Logistic 方程求出 A、B 两组冰冻半致死温度 (LT50) 分别为 -43.14°C 和 -52.22°C , 二者均低于哈尔滨历史极限最低温度, 表明在哈尔滨地区引种大叶铁线莲种子与多年生苗木是可行的。

2.2 超氧化歧化酶 (SOD) 活性对不同低温胁迫的响应

A 组 SOD 活力随着温度的降低升高—降低, B 组呈现出升高—降低—升高的变化趋势。低温胁迫条件下, A 组 SOD 活性变化趋势剧烈, B 组的 SOD 活性变化趋势平缓, 二者在 0°C 时均出现最高值, 表明大叶铁线莲在

第一作者简介: 马迪 (1983-), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物种质资源。

通讯作者: 岳桦 (1962-), 女, 教授, 硕士生导师, 现从事园林植物资源与应用研究工作。E-mail: yuehua0123@126.com。

收稿日期: 2009-12-20

此温度下有明显清除体内有害物质引起的超氧自由基,从而减少因此引起的过氧化损伤,起到保护植物的作用^[4]。A组在-40℃时出现了最低值;B组在-20℃时出现了最低值,且低于CK,表明大叶铁线莲体内清除氧自由基的能力显著降低,因而低温已经引起的伤害,对于A组SOD的保护作用可以持续到-30℃,B组只能维持在-10℃。SOD活性变化规律与孙昌祖等^[5]研究低温胁迫对青杨叶片保护酶的影响结果一致。

2.3 可溶性蛋白质含量对低温胁迫的响应

已有研究表明,低温胁迫下,植物可溶性蛋白质含量增加^[6-8]。但大叶铁线莲在低温胁迫下,其A组可溶性蛋白质含量随着温度的降低呈现出单峰曲线,B组则呈现出双峰曲线。A、B2组在低温胁迫过程初期,低温促进植物体内某些蛋白的合成,增加的可溶性蛋白质的增加可以束缚更多的水分,还可以减少原生质因结冰而伤害致死的机率,A组在-40℃时达到最低点,B组在0~-20℃及-30℃后的过程中可溶性蛋白质含量降低;后期由于体内代谢消耗的有机物质氨基酸使得可溶性蛋白的含量,才呈现出下降趋势,失去了原有的保护功能。-20~-30℃过程中可溶性蛋白质含量出现上升趋势。这种变化趋势与詹福建等^[9]对马占相思树在低温处理期间可溶性蛋白质含量的变化研究中的变化趋势相同,可能的原因是植物因低温产生了特异蛋白(如:抗冻蛋白等)。

2.4 丙二醛(MDA)含量对低温胁迫的响应

MDA含量变化可以代表质膜受损伤的程度,MDA含量越高质膜受损伤的程度越高^[10]。由表1、2可知,A

组MDA含量随着温度的降低呈现出上升一降低的趋势,B组则呈现出升高一降低一升高的趋势。A、B2组在低温胁迫的初期均表现出MDA含量升高,表明植物的质膜受损伤,但很快MDA含量降低说明植物自我保护作用起到缓解低温对之无伤害的作用。A组在0~-10℃过程中MDA含量明显降低,之后变化相对平缓;B组在0℃~-10℃及过程中可溶性蛋白质含量明显降低,通过植物自我保护作用降低对植物的伤害降到最低。B组-10~-40℃过程中MDA含量呈现上升趋势表明,此时的温度对膜系统再次造成伤害,已经超出植物自身所承受的能力范围了。

2.5 脯氨酸含量对低温胁迫的响应

一般情况下逆境中的植物其体内的脯氨酸会大量的积累,这是植物对不良环境的一种适应性反映^[11]。有研究表明^[12]脯氨酸含量随着温度的下降而上升,该试验结果与此不一致。试验中脯氨酸含量随着温度的降低而降低,呈现出明显正相关性。由表1、2可知,A、B2组脯氨酸含量均呈现出随着温度的降低呈现出降低的趋势。A组在温度从CK下降到0℃和-10℃下降到-20℃时脯氨酸含量明显下降;B组-10℃下降到-20℃时脯氨酸含量明显下降。相似结果在魏娜、艾琳等^[16-17]研究中有出现。脯氨酸的积累是由植物体内脯氨酸生物合成激活和脯氨酸降解的抑制共同导致的^[13-15],并非是单因子影响的,虽然在试验中脯氨酸含量变化呈现出一定的变化规律且规律性明显,但是关于低温对脯氨酸代谢的调节机理我们了解很少,但是有待于进一步深入研究。

表1 不同低温胁迫下1a生大叶铁线莲各因子含量差异

胁迫温度/℃	相对电导率/%	SOD活性/U·g ⁻¹	可溶性蛋白含量/mg·g ⁻¹	丙二醛含量/μmol·g ⁻¹	脯氨酸含量/μg·mL ⁻¹
CK	0.3203±0.00333	62.4823±0.0017	2.4863±0.00032	0.004638±0.00002	0.546853±0.0014
0℃	0.6239±0.00065	158.3828±0.00481	3.8052±0.00058	0.006418±0.00001	0.345617±0.00059
-10℃	0.7218±0.00348	123.6451±0.05898	3.7076±0.00051	0.003121±0.00001	0.360217±0.00091
-20℃	0.8765±0.0028	79.2809±0.05593	2.1707±0.00143	0.003647±0.00001	0.121503±0.00036
-30℃	0.8712±0.00351	72.1958±0.04758	1.7727±0.00224	0.002922±0.00001	0.069307±0.00008
-40℃	0.8852±0.0034	31.9519±0.07256	1.142±0.00198	0.002002±0.00001	0.108183±0.00002

表2 不同低温胁迫下4a生大叶铁线莲各因子含量差异

胁迫温度/℃	相对电导率/%	SOD活性/U·g ⁻¹	可溶性蛋白含量/mg·g ⁻¹	丙二醛含量/μmol·g ⁻¹	和脯氨酸含量/μg·mL ⁻¹
CK	0.4195±0.00052	46.0874±0.00266	2.4139±0.00111	0.012178±0.00001	0.49615±0.00089
0℃	0.3879±0.00426	51.1406±0.00243	3.1101±0.00147	0.017044±0.00001	0.377783±0.00139
-10℃	0.4828±0.0049	26.9362±0.0322	2.0415±0.00207	0.010197±0.00001	0.309373±0.0006
-20℃	0.7645±0.00306	12.2914±0.03411	1.7137±0.00069	0.013418±0.00001	0.022217±0.00082
-30℃	0.758±0.00671	39.9693±0.05241	2.781±0.00177	0.016185±0.00002	0.03101±0.00016
-40℃	0.7607±0.00969	24.1315±0.01183	1.6081±0.00231	0.018747±0.00001	0.010317±0.00027

2.6 不同低温胁迫下不同生理因子的相关性

从表3、4可知,A、B组在低温胁迫下,温度与相对电导率、可溶性蛋白含量和脯氨酸含量相关性显著($P<0.01$),可见相对电导率、可溶性蛋白含量和脯氨酸含量变化可以作为大叶铁线莲对低温响应的衡量标准;相对

电导率与丙二醛(MDA)含量和脯氨酸含量相关性显著($P<0.01$),可溶性蛋白含量与脯氨酸含量相关性显著($P<0.01$),表明几者之间具有紧密的相关性,可以通过单一因素推论另外几者,为所得结论提供佐证。

表 3 不同低温胁迫下 1 a 生大叶铁线莲各因子相关性

	Tem	SOD	Conductivity	DP	MDA	Pro
Tem	1	-0.535 *	0.915 **	-0.722 **	-0.424	-0.923 **
SOD	-0.535 *	1	-0.455	0.934 **	0.672 **	0.349
Conductivity	0.915 **	-0.455	1	-0.597 **	-0.605 **	-0.894 **
DP	-0.722 **	0.934 **	-0.597 **	1	0.538 *	0.617 **
MDA	-0.424	0.672 **	-0.605 **	0.538 *	1	0.277
Pro	-0.923 **	0.349	-0.894 **	0.617 **	0.277	1

表 4 不同低温胁迫下 4 a 生大叶铁线莲各因子相关性

	Tem	SOD	Conductivity	DP	MDA	Pro
Tem	1	0.042	0.828 **	-0.671 **	0.590 **	-0.942 **
SOD	0.042	1	0.229	-0.189	0.094	-0.200
Conductivity	0.828 **	0.229	1	-0.409	0.821 **	-0.927 **
DP	-0.671 **	-0.189	-0.409	1	-0.069	0.676 **
MDA	0.590 **	0.094	0.821 **	-0.069	1	-0.613 **
Pro	-0.942 **	-0.200	-0.927 **	0.676 **	-0.613 **	1

注: Tem—温度, Conductivity—相对电导率, DP—可溶性蛋白含量, MDA—丙二醛含量, Pro—脯氨酸含量; *代表相关关系达到显著水平($P<0.05$), **代表相关关系达到显著水平($P<0.01$)。

3 小结

在经过人为设定降温梯度下模拟低温胁迫,发现低温对大叶铁线莲生长有影响,且不同发育阶段的大叶铁线莲理论最低抗寒极限分别是一43.14℃和一52.22℃,这表明不同发育阶段同种植物抗寒能力有差异性的,随着苗龄的增加抗寒性增强。

试验中各因子中相对电导率、可溶性蛋白含量和脯氨酸含量与温度相关性显著($P<0.01$),这3个因子可以作为评价其抗寒性的评价因子,且3因子之间具有联系:质膜透性直接影响相对电导率,细胞膜一般是以蛋白质和脂质为主,可溶性蛋白含量多少直接影响质膜的透性,即间接影响到相对电导率;脯氨酸含量对植物内环境酸碱平衡具有影响,内环境直接影响可溶性蛋白的水解程度,间接起到影响植物抗寒性。

分析上述结果表明,在哈尔滨地区既可以引种大叶铁线莲的种子亦可以引种多年生成苗作为造景应用的植物材料,以达到丰富高寒地区植物景观的目的。

Response on Physiology and Biochemistry of *Clematis heracleifolia* under Low-temperature Stress

MA Di, YUE Hua

(College of Landscape Architecture of Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: By means of the stress of different low-temperatures for the *Clematis heracleifolia*, several physio-biochemical changes of their roots have been determined under the low-temperature stress to seek the cold resistance of the *Clematis heracleifolia*. The results showed that under the low temperature condition, the variation of relative electric conductance, which expressed the variation of cell membranes permeation, became much stronger and increased following a “S” shape. The activity of the SOD, the content of dissoluble protein and MDA presented to rise first and then drop. The content of proline all decreased during the freeing period. The association study indicated that the conductivity, dissoluble protein and proline can judge of the cold resistance of the *Clematis heracleifolia*. And it can be used in Harbin by working with the logistic equations.

Key words: *Clematis heracleifolia*; low-temperature stress; cell membrane permeability; SOD; dissoluble protein; MDA; proline

参考文献

[1] 岳玉泉. 哈尔滨市志-自然地理志[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1993.

[2] 刘玉莲, 周海龙, 苍蕴琦. 四季分明是哈尔滨气候的显著特征[J]. 黑龙江气象, 2003(4): 21-28.

[3] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 1版. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-260.

[4] 曹锡清. 膜质过氧化对细胞与机体的作用[J]. 生物化学与生物物理学进展, 1986(2): 17-23.

[5] 孙昌祖, 刘家琪. 低温胁迫对青杨叶片 O_2^- 、MDA、膜透性、叶水势及保护酶的影响[J]. 内蒙古林学院学报, 1998 3(2): 31-36.

[6] 万清林, 刘鸣远. 芸香抗寒生理的初步研究[J]. 植物研究, 1997 17(2): 190-194.

[7] 车代弟, 王军虹, 刘慧民. 丰花月季抗寒生理指标和抗寒性的关系[J]. 北方园艺, 2000(2): 57.

[8] Chen W H, Li T H. Biochemical changes in tuber-bearing solanum spices in relation to frost hardiness during the cold acclimation[J]. Plant Physiol, 1980 66: 414.

[9] 詹福建, 巫光宏, 黄卓烈等. 马占相思树对低温冻害的抗性研究[J]. 林业科学, 2003, 39(1): 56-61.

[10] 陈贵, 胡文玉, 谢甫锦等. 提取植物体内的MDA的溶剂及MDA作为衰老指标的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(1): 44-46.

[11] Hare P D, Cress W A, van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress[J]. Plant Cell Environ, 1998, 21: 535-553.

[12] 陈杰忠, 徐春香, 梁立峰. 低温对香蕉叶片中蛋白质及脯氨酸的影响[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(3): 54-58.

[13] 赵福庚, 刘友良. 胁迫条件下高等植物体内脯氨酸代谢及调节的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 9-16.

[14] 曹仪植, 吕忠恕. 水分胁迫下植物体内脯氨酸的累积 ABA 在其中的作用[J]. 植物生理学报, 1985, 11(1): 9-16.

[15] 赵可夫. 不同类型盐生植物脯氨酸含量的测定[J]. 曲阜师院学报(植物抗盐生理专刊), 1984, 23-46.

[16] 魏娜, 欧小平, 董丽. 10 种宿根花卉抗寒性研究初报[J]. 中国农学通报, 2008 7(24): 314-317.

[17] Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, et al A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 1998, 118: 1233-1241.