

早实核桃对低温胁迫的生理响应及抗寒性评价

孙红梅, 刘杜玲, 杨吉安, 张博勇, 朱海兰

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用人工模拟低温环境的方法,以9 a生早实核桃“香玲”和“辽核4号”离体新梢为试材,在低温胁迫下,测定细胞质膜透性、丙二醛含量、可溶性糖含量、脯氨酸含量及SOD活性,并进行生长恢复试验,用相关分析确定评价早实核桃抗寒性的生理生化指标,用隶属函数法对2个品种抗寒性进行综合评价。结果表明:随温度降低,2个品种相对电导率呈“S”型曲线;丙二醛含量呈升-降-升的趋势;可溶性糖含量先升高后降低趋势;“香玲”和“辽核4号”脯氨酸含量分别呈升-降-升-降和先升后降的趋势;“香玲”和“辽核4号”SOD活性分别呈先升后降和升-降-升-降的趋势。确定相对电导率、半致死温度、可溶性糖含量和脯氨酸含量作为评价核桃抗寒性的指标;2个品种抗寒性综合评价结果为:“辽核4号”>“香玲”。

关键词:早实核桃;低温胁迫;生理响应;综合评价

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0017-04

核桃(*Juglans regia* L.)是世界著名的四大坚果之一^[1],是我国重要的经济林树种,具有很高的经济价值,近年来全国各地核桃种植面积发展很快,总产量不断攀升。但在我国北方核桃栽植区,普遍存在倒春寒和晚霜危害,使核桃雌花芽、新梢、幼果严重受冻,造成核桃产量大幅度下降甚至绝收^[2],严重地制约着核桃生产的发展和经济效益的提高。因此,研究低温胁迫对核桃的伤害作用及其抗寒机制,具有重要的理论价值和生产指导意义。试验采用人工模拟低温环境的方法,以早实核桃良种“香玲”和“辽核4号”新梢为试材,研究低温胁迫下核桃新梢生理生化指标的变化,并对其抗寒性进行综合评价,旨在为早实核桃引种及科学栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自陕西省兴平市马嵬镇早实核桃良种园,树龄9 a。于2011年4月15日选择生长势基本一致的各品种单株5株,在树冠同方向、同部位采取粗度、长度一致的新梢,采摘后立即用湿纱布包裹,标记好品种、日期,装入密封袋中速带回实验室备用。

1.2 试验方法

1.2.1 低温处理方法 将材料置于智能低温人工气候箱(RZX-0128型)中进行模拟低温处理,设置温度梯度为:15(CK)、3、0、-3、-6、-9℃,人工气候箱温度在15℃时将材料放入,之后缓慢降温,当温度降至目标温度后维持6 h,随后又以同样的速度升温,升至3℃和15℃时分别恢复1 h,降温速度为1℃/h。试验5次重复。经低温处理后,一部分新梢进行恢复生长试验,另一部分用液氮速冻后放入-70℃的超低温冰箱中以测定生理生化指标。

1.2.2 指标测定方法 细胞膜透性采用电导法测定^[3];丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸法^[4];可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法^[5];游离脯氨酸含量测定采用酸性茚三酮法^[5];SOD活性测定采用高俊凤^[5]的方法,每个指标重复测定3次。

1.2.3 恢复生长 将不同温度处理后的新梢于15℃室温水培,进行生长恢复,15 d后统计存活率^[6],以存活率高低作为核桃是否遭受冻害和衡量抗寒性强弱的指标^[7-8]。

1.2.4 抗寒性综合评价 应用Fuzzy数学中隶属函数法^[2],综合各项指标对2个早实核桃品种进行抗寒性评价。与抗寒性呈正相关的指标可溶性糖、游离脯氨酸,采用公式: $U_{ijk} = (X_{ijk} - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$ 。与抗寒性呈负相关的指标相对电导率、半致死温度(LT₅₀),采用公式: $U_{ijk} = 1 - (X_{ijk} - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$,式中, U_{ijk} 为第*i*个品种第*j*个处理温度第*k*项指标的隶属度,且 $U_{ijk} \in [0, 1]$; X_{ijk} 为第*i*个品种第*j*个处理温度第*k*项指

第一作者简介:孙红梅(1987-),女,在读硕士,研究方向为森林培育理论与技术。

责任作者:刘杜玲(1964-),女,硕士,副教授,现主要从事经济林栽培教学与科研工作。E-mail:liudl606@126.com。

基金项目:陕西省农业攻关资助项目(2010K01-26)。

收稿日期:2012-04-26

标的测定值; X_{\max} 、 X_{\min} 表示所有参试品种中第 k 项指标的最大值和最小值。

1.3 数据分析

应用 SPSS 软件和 Excel 进行数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 不同低温处理下细胞质膜透性的变化及半致死温度的确定

由图 1 可知,随温度降低,“香玲”和“辽核 4 号”相对电导率均上升,变化趋势基本一致。温度由 15℃ 降至 3℃ 时,2 个品种相对电导率上升缓慢;由 3℃ 降至 -6℃ 时相对电导率迅速上升;由 -6℃ 降至 -9℃ 时相对电导率上升缓慢,电导率随低温变化呈“S”型曲线。经方差分析,同一品种在不同温度(0、-3、-6℃)下电导率差异极显著($P < 0.01$),不同品种在同一温度(除 -9℃ 外)下

电导率差异显著($P < 0.05$)。根据相对电导率随温度的变化趋势,配合 Logistic 方程得到“香玲”和“辽核 4 号”的半致死温度(LT_{50})分别为 -3.13℃ 和 -3.30℃ (表 1)。

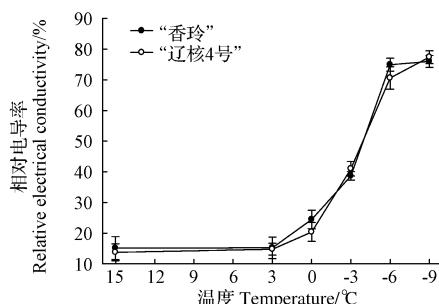


图 1 不同低温处理下 2 个核桃品种相对电导率的变化

Fig. 1 Effect of low temperature on relative electrical conductivity of two precocity walnut cultivars

表 1 不同低温处理下 2 个核桃品种电解质外渗率拟合 Logistic 方程及拐点温度

Table 1 Logistic equation of the relative electrical conductivity(%) of two precocity walnut cultivars and the median lethal temperature ($LT_{50}/^{\circ}\text{C}$) during the drops in temperature

品种	CK	3	0	-3	-6	-9	Logistic 方程	$LT_{50}/^{\circ}\text{C}$	拟合度 R^2
“香玲”	15.10	15.23	24.48	38.68	74.93	76.00	$y=92.604/(1+2.673e^{0.314x})$	-3.13	0.906
“辽核 4 号”	13.77	14.77	20.38	41.01	70.61	77.42	$y=92.170/(1+2.947e^{0.328x})$	-3.30	0.937

2.2 不同低温处理下丙二醛含量的变化

由图 2 可知,“香玲”和“辽核 4 号”的 MDA 含量随温度的降低均呈现升-降-升的趋势,但开始下降和上升的温度不同。“香玲”在温度降至 3℃ 前,MDA 含量上升,3℃ 后 MDA 含量开始下降,到 -3℃ 时含量较低, -3℃ 后又上升,至 -9℃ 时达最大;“辽核 4 号”在温度降至 -3℃ 前 MDA 含量上升, -3~ -6℃ 迅速下降, -6~ -9℃ 迅速上升。方差分析结果表明,同一品种在不同温度(3、-3、-6℃)下 MDA 含量差异显著($P < 0.05$),不同品种在同一温度下 MDA 含量差异极显著($P < 0.01$)。

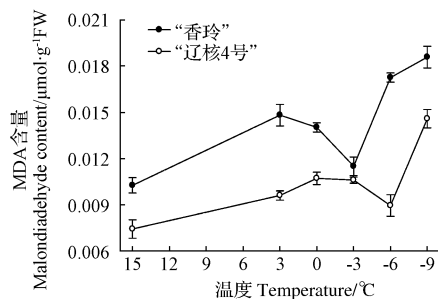


图 2 不同低温处理下 2 个核桃品种丙二醛含量的变化

Fig. 2 Effect of low temperature on MDA content of two precocity walnut cultivars

2.3 不同低温处理下可溶性糖含量的变化

由图 3 可知,随温度降低,“香玲”和“辽核 4 号”可溶性糖含量均呈现先升高后降低的趋势,但上升和下降的

幅度、开始下降的温度不同。“香玲”在温度降至 3℃ 之前上升,3℃ 后下降;“辽核 4 号”在 0℃ 之前上升,0℃ 后下降,说明“辽核 4 号”更能忍耐低温胁迫,抗寒性相对较强。方差分析结果表明,同一品种在不同温度(3、0、-3℃)下可溶性糖含量差异显著($P < 0.05$),不同品种在同一温度下可溶性糖含量差异极显著($P < 0.01$)。

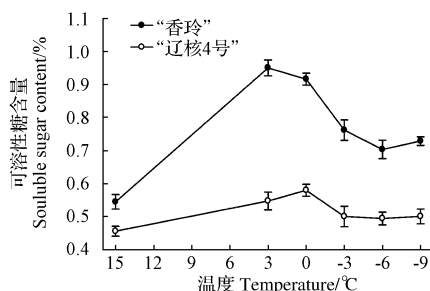


图 3 不同低温处理下 2 个核桃品种可溶性糖含量的变化

Fig. 3 Effect of low temperature on soluble sugar content of two precocity walnut cultivars

2.4 不同低温处理下游离脯氨酸含量的变化

脯氨酸作为一种重要的渗透调节物质,使植物通过自身调节适应逆境环境。由图 4 可知,随温度降低,“香玲”脯氨酸含量呈先升后降再升再降的趋势,在 3℃ 和 -6℃ 时出现了 2 个峰值,且前一个高于后一个。在温度降至 3℃ 之前上升,在 3℃ 达最大含量,比对照增加了 145.4%,在 -6℃ 时比对照增加了 101.7%;“辽核 4 号”脯氨酸含量随温度降低呈先升后降的趋势, -3℃ 之前

上升,在 -3°C 达最大含量, -3°C 后开始下降。“辽核4号”脯氨酸含量总体上升的幅度(“香玲”为58.20%，“辽核4号”为71.24%)较大,且开始下降时的温度较低,说明其对低温有更强的忍耐力。方差分析结果表明,同一品种在不同温度(0、 -3 、 -6°C)下、不同品种在同一温度下脯氨酸含量差异显著($P<0.05$)。

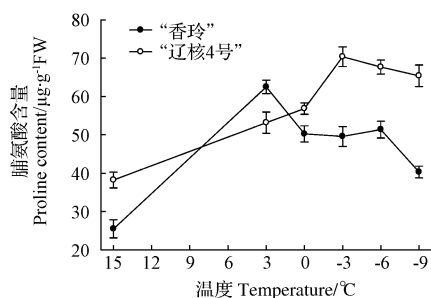


图4 不同低温处理下2个核桃品种脯氨酸含量的变化

Fig. 4 Effect of low temperature on proline content of two precocity walnut cultivars

2.5 不同低温处理下SOD活性的变化

由图5可知,“香玲”和“辽核4号”随温度的降低变化趋势不同。“香玲”SOD活性先上升后下降,在 3°C 之前,SOD活性升高, 3°C 后,SOD活性降低;“辽核4号”SOD活性呈升-降-升-降的趋势,在 3°C 之前上升, $3\sim 0^{\circ}\text{C}$ 时下降, $0\sim -3^{\circ}\text{C}$ 又上升, $-3\sim -9^{\circ}\text{C}$ 时再次下降,呈双“S”型曲线变化。方差分析结果显示,同一品种在不同温度下、不同品种在同一温度(除 0°C 外)下SOD活性差异极显著($P<0.01$)。

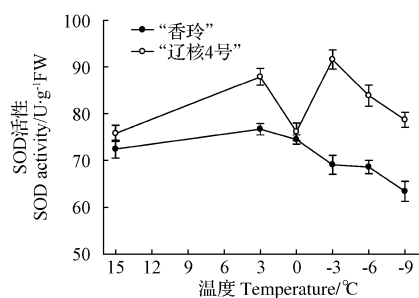


图5 不同低温处理下2个核桃品种SOD活性的变化

Fig. 5 Effect of low temperature on SOD activity of two precocity walnut cultivars

2.6 低温处理后早实核桃新梢恢复生长情况

由表2可知,随温度降低,2个品种新梢存活率均降低。经 -3°C 处理后,“香玲”和“辽核4号”新梢存活率分别为13.2%和69.1%,分别比对照降低了86.2%和30.9%; -6°C 处理后,“香玲”和“辽核4号”新梢存活率分别为0和47.3%,分别比对照降低了100%和52.7%; -9°C 处理后2个品种新梢存活率均为0。经 -3°C 低温处理后,2个品种存活率明显下降,且品种间差异较大,因此 -3°C 处理下的新梢存活率可作为抗寒性的衡量指标。

表2 恢复生长后核桃新梢的存活率

Table 2 Walnut shoots' recovering rate following low temperature %

品种	处理温度/ $^{\circ}\text{C}$					
	15(CK)	3	0	-3	-6	-9
“香玲”	95.7	79.5	49.5	13.2	0	0
“辽核4号”	100	91.2	89.7	69.1	47.3	0

2.7 抗寒指标相关分析与选取

采用SPSS软件对2个核桃品种在 -3°C 低温处理后新梢存活率与生理生化指标的相关分析表明,2个品种新梢存活率与相对电导率、半致死温度(LT_{50})呈极显著负相关,与可溶性糖呈极显著正相关;与游离脯氨酸呈显著正相关(表3),因此选取与抗寒性极显著和显著的相对电导率、半致死温度、可溶性糖及脯氨酸作为早实核桃抗寒性评价的指标。

表3 低温处理下核桃新梢存活率与生理生化指标的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of walnut shoots' recovering rate and physiological-biochemical indicators during low temperature

相关指标	相对电导率	LT_{50}	丙二醛	可溶性糖	游离脯氨酸	SOD活性
存活率	-0.849**	-0.831**	-0.398	0.765**	0.613*	0.238

注: **表示极显著($P<0.01$), *表示显著($P<0.05$)。

2.8 早实核桃抗寒性综合评价

核桃的抗寒性是多项指标综合作用的结果,为了较全面地反映其抗寒性,运用隶属函数法,综合各项相关指标用平均隶属度对2个早实核桃品种的抗寒能力进行综合评价。平均隶属度越大,表明抗寒能力越强,反之抗寒能力越弱。由表4可知,“辽核4号”的抗寒性明显强于“香玲”。

表4 早实核桃品种抗寒指标隶属度及抗寒性综合评价

Table 4 Subordination value of cold resistance indicator and synthetic evaluation of cold resistance of precocity walnut cultivars

品种	相对电导率/%	$LT_{50}/^{\circ}\text{C}$	可溶性糖含量/%	脯氨酸含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	平均隶属度	位次
“香玲”	0.576	0	0.553	0.470	0.400	2
“辽核4号”	0.593	1	0.097	0.736	0.607	1

3 讨论与结论

研究证明,抗寒性与植物的细胞膜结构、生理活性及其酶防御系统的活性具有密切关系^[9],植物通过一系列生理生化和分子生物学变化等调节机制来适应低温环境,即抗寒性是植物自身生理生化特性综合作用的遗传表现,单一指标难于判断植物对低温的综合适应能力^[10]。该研究中,随温度的降低,“香玲”和“辽核4号”的相对电导率均升高,呈“S”型曲线变化,这与许瑛等^[6]和郭卫东等^[11]的研究结果一致。

MDA是植物体低温胁迫后的质膜过氧化产物,保护酶SOD、POD和CAT则对其进行清除,对细胞起保护作用。该研究中,MDA含量呈先升后降再升的趋势,SOD活性先升高后降低。说明低温胁迫初期,保护酶活

性增加并不显著,清除细胞内自由基作用不明显;随温度降低,保护酶系统活性增强,渗透调节物质增多,清除细胞内自由基加强;后随着温度的继续降低,植物体内代谢失衡,酶活性降低,或极限低温导致酶失活,清除自由基的能力下降,致使MDA含量再次升高。二者之间呈动态变化的关系,是由于各品种自身的防御机制综合参与的结果^[12]。

可溶性糖和游离脯氨酸作为渗透调节物质,其积累可提高细胞保水能力,对生物膜起保护作用^[10],同时,可溶性糖可为离体植物材料提供能量。该研究中,2个品种可溶性糖含量均随温度的降低呈先升后降趋势,崔帅等^[13]的抗寒性研究中有同样结果。“香玲”脯氨酸含量随温度的降低呈升-降-升-降的趋势,这与刘晓东等^[14]关于抗寒性的研究结果一致;“辽核4号”脯氨酸含量随温度降低先升后降,这与草地早熟禾(*Poa pretensis*)^[15]和禾本科牧草^[10]的抗寒性研究结果一致。在胁迫初期,植物体为适应低温环境,通过平衡自身代谢使调节物质增多来增强自身抗寒能力^[16],随着温度的继续降低,诱导调节物质合成的酶活性降低,离体试材也需要能量供应,或超出自身的防御能力,机体受到伤害,使可溶性糖和脯氨酸含量降低。由此可见,可溶性糖和脯氨酸在植物抵抗逆境环境中起着非常重要的作用。

试验通过相关分析,筛选出与抗寒性极显著、显著相关的相对电导率、半致死温度、可溶性糖及脯氨酸,用隶属函数对不同早实核桃品种抗寒性进行评价,得出“辽核4号”抗寒性强于“香玲”。为进一步更全面、准确地评价核桃的抗寒性,还应结合田间冻害调查、低温胁迫下形态变化、组织结构的变化等多项指标进行综合评定。

参考文献

- [1] 郝荣庭,张毅萍.中国果树志·核桃卷[M].北京:中国林业出版社,1992:50-80.
- [2] 相昆,张美勇,徐颖,等.不同核桃品种耐寒特性综合评价[J].应用生态学报,2011,22(9):2325-2330.
- [3] 赵世杰,史国安.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业科学技术出版社,2002.
- [4] 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.
- [5] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000.
- [6] 许瑛,陈发棣.菊花8个品种的低温半致死温度及其抗寒适应性[J].园艺学报,2008,35(4):559-564.
- [7] 柳新红,何小勇,苏冬梅,等.翅荚木种源抗寒性综合评价体系的构建与应用[J].林业科学,2007,43(10):45-50.
- [8] 吕跃东,董凤祥,王贵禧,等.平欧杂交榛抗寒性综合评级体系的建立与应用[J].林业科学,2008,44(9):31-35.
- [9] 杨建民,周怀军,王文凤.果树霜冻害研究进展[J].河北农业大学学报,2000,23(3):54-58.
- [10] 李铁冰,杨顺强,任广鑫,等.低温处理下不同禾本科牧草的生理变化及其抗寒性比较[J].生态学报,2009,29(3):1341-1347.
- [11] 郭卫东,张真真,蒋小伟,等.低温胁迫下佛手半致死温度测定和抗寒性分析[J].园艺学报,2009,36(1):81-86.
- [12] 邱乾栋.桂花对低温胁迫适应性的研究[D].泰安:山东农业大学,2010.
- [13] 崔帅,赵兰勇,李承水,等.卫矛属3种常绿阔叶树木抗寒性研究[J].中国农学通报,2012,28(7):17-20.
- [14] 刘晓东,翟晓宇,施冰.金叶风箱果和紫叶风箱果的抗寒性[J].东北林业大学学报,2011,39(4):18-20.
- [15] 滕祥金,孙玉刚,吴姝菊,等.不同草地早熟禾品种抗寒性研究[J].北方园艺,2011(8):90-92.
- [16] 王宁,吴军,夏鹏云,等.大叶冬青对低温胁迫的生理响应及抗寒性分析[J].华南农业大学学报,2011,32(3):82-86.

Response on Physiology and Biochemistry and Cold Resistance Evaluation of Precocity Walnut Cultivar Under Low Temperature Stress

SUN Hong-mei, LIU Du-ling, YANG Ji-an, ZHANG Bo-yong, ZHU Hai-lan

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: The membrane permeability of 9 years old ‘Xiangling’ and ‘Liaohe No. 4’ shoots, malondialdehyde content, the soluble sugar and praline content and SOD activity were investigated with the method of artificial simulation of low-temperature. Besides, the recovering growth situations were observed. Physiological-biochemical indicators were determined by correlation analysis and the cold resistance of the two walnut cultivars was evaluated by using fuzzy mathematics method. The results showed that the relative electric conductivity of the two walnut cultivars increased strongly with following an ‘S’ shape during the drops in temperature. The malondialdehyde content increased at first, then decreased and increased again. The soluble sugar showed a tendency of increasing at the initial stage of the low temperature and decreasing later. Praline content of ‘Xiangling’ increased at first, then decreased and then increased and decreased again and that of ‘Liaohe No. 4’ showed a tendency of increasing at first and decreasing later. SOD activity of ‘Xiangling’ increased at the initial stage and decreased later and that of ‘Liaohe No. 4’ increased at first, then decreased and then increased and decreased again. The conductivity, semilethal temperature, the soluble sugar and praline content were determined to evaluate the cold resistance of walnut cultivars. The cold-resistance of test walnut was evaluated as ‘Liaohe No. 4’ > ‘Xiangling’.

Key words: precocity walnut; cold resistance; physiological response; comprehensive evaluation