

DOI:10.11937/bfyy.201503026

持续低温胁迫下大花蕙兰不同组织器官耐寒响应

唐 敏

(成都农业科技职业学院,四川 温江 611130)

摘 要:采用自然降温处理,分别测定了大花蕙兰地上部分和地下部分中丙二醛(MDA)含量、膜透性(CMP)、可溶性蛋白质(SP)含量、可溶性糖(SS)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性和过氧化氢酶(CAT)活性等与耐寒性有关的生理指标,比较地上部分和地下部分耐寒差异性,研究低温胁迫对大花蕙兰组培苗生理特性的影响。结果表明:POD活性、可溶性蛋白质含量和可溶性糖含量在反映大花蕙兰组培苗耐寒性方面作用明显,可作为其耐寒性鉴定指标;地上部分和地下部分在耐寒性提高时表现出的一致性,后者比前者表现出更强的耐寒性能。

关键词:大花蕙兰;组培苗;自然降温;耐寒性

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0084-04

大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)属兰科兰属多年生草本植物,为一部分附生性种类的杂交种^[1],抗寒性较差^[2]。目前,对其研究多集中于组织培养^[3]、花期调控^[4]及移栽基质方面^[5],组织间耐寒性差异尚鲜见研究。

研究表明,植物不同器官抗寒性不同^[6],该抗寒遗传特性不仅与其自身形态结构特征(如叶片组织结构、茎的组织结构和花器官组织结构等)和外界环境条件有关,且取决于器官内部生理生化活动。该试验在前人研究低温胁迫对植物生理生化响应基础上,分器官探讨自然降温过程中大花蕙兰幼苗抗寒性作用机理及器官间耐寒性差异,以期改善低温胁迫下大花蕙兰栽培管理辅助措施提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于2011年10月至2012年1月在四川农业大学成都校区实验基地(东经103°51′、北纬30°42′)进行。该基地海拔536 m,属亚热带湿润季风气候;年平均气温15.9℃,年最高气温35.4℃(7月),年最低气温-5.1℃(1月);年平均降水量966.1 mm。

1.2 试验材料

供试材料为经过继代培养的大花蕙兰“晨晖”(C. Twilight Moon‘Daylight’)品种无菌苗丛,株高约6 cm,

每株真叶3~4片。试验所用试剂纯度均为分析纯。

1.3 试验方法

从经过继代培养的大花蕙兰无菌苗丛中剪取生长情况一致、株高约6 cm的幼苗,在无菌条件下分别接种于生根培养基中(1/2MS+30 g/L蔗糖+6 g/L琼脂+1 g/L活性炭(1/2MS培养基成分及配制步骤参照文献[7]),生根培养容器规格为直径8 cm×高13 cm,带橡胶塞的玻璃瓶。调pH 5.8,每瓶接种2株,共接种50瓶,接种后于光照强度1 500~2 000 lx,光照时间12 h/d,温度(25±2)℃的无菌室培养20 d;20 d后选取生长状况相似且良好的幼苗60株,分为3组作为重复,每组20株幼苗,于室内练苗5 d后(2011年11月20日)移栽至兰花专用混合基质中,移栽所用容器为直径10 cm×高12 cm的塑料盆,每盆移栽1株幼苗,放置光照强度为8 000 lx,光照时间12 h/d,温度(25±2)℃的光照培养箱中培养,每隔3 d检查水分情况,适量浇水,维持土壤湿润。

于2011年12月20日(即自然降温前)第1次取样(取样材料为植株顶叶下第3~4枚功能叶片与生长健壮的根)作对照(CK);以自然降温作为低温胁迫处理条件,第1次取样后将幼苗置于室外,进行自然降温培养,分别在2011年12月31日(日最高温12℃,日最低温5℃),2012年1月11日(日最高温7℃,日最低温4℃),2012年1月22日(日最高温5℃,日最低温1℃)取样,并分别设定为处理1、处理2、处理3。每次取样于8:00—9:00进行,迅速取样后用自封袋封好,放于冰中带回实验室,将各处理幼苗用蒸馏水冲洗干净并用吸水纸快速吸干水分后,将叶与根分离,立即进行相关生理指标的测定,3次重复。

作者简介:唐敏(1981-),女,四川成都人,硕士,讲师,现主要从事植物组织培养技术与植物生理等研究工作。E-mail:45534141@qq.com.

收稿日期:2014-09-04

1.4 项目测定

生物量增量:分别于 2011 年 12 月 20 日、2011 年 12 月 31 日、2012 年 1 月 11 日、2012 年 1 月 22 日,将植株带回实验室,用蒸馏水冲洗干净并用吸水纸快速吸干水分后,将根和叶剪开装入纱袋,105℃ 杀青 30 min 后,70℃ 下烘至恒重,称重得生物量。生物量增量 $\Delta m(g)$ =处理 n 生物量(m_n)-处理($n-1$)生物量(m_{n-1})。2011 年 12 月 20 日所得生物量增量(CK)为该日生物量减去前 11 d 所测生物量。

丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法^[8];可溶性糖(SS)含量测定采用蒽酮比色法;可溶性蛋白质(SP)含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法;超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性及过氧化氢酶(CAT)活性的测定参照文献^[9]的方法;细胞膜透性(PMP)测定采用电导法^[9]。

1.5 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件对试验数据进行统计分析,数据均为 3 次重复的平均值 \pm 标准差,采用单因素方差分析和显著差异法比较不同处理组间的差异。

2 结果与分析

2.1 试验过程中的气温变化

该试验过程中,成都地区 2011 年 12 月 25 日至 2012 年 1 月 25 日的日最高和最低气温如图 1 所示,4 次取样时间分别为 2011 年 12 月 20 日、2011 年 12 月 31 日、2012 年 1 月 11 日、2012 年 1 月 22 日,其当日最低气温分别为 15、5、4、1℃。

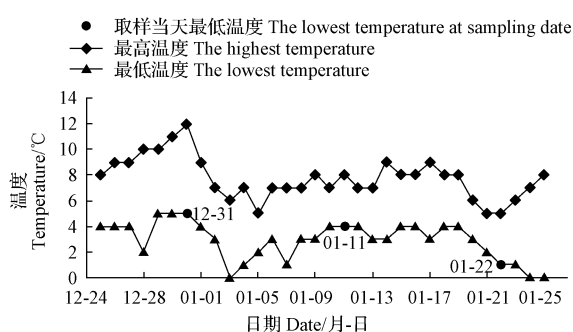


图 1 2011 年 12 月 25 日至 2012 年 1 月 25 日
成都气温日最高与最低温度

Fig.1 The highest and lowest day temperature of Chengdu city from December 25 in 2011 to January 25 in 2012

2.2 自然降温过程中大花蕙兰组培苗不同组织器官生物量增量

从表 1 可以看出,自然降温对大花蕙兰不同器官的生物量增量均有影响,具体表现为,器官的生物量增量均随自然降温的进行呈先降后升的趋势。其中,降温最后一次地上部生物量增量与 CK 差异显著($P<0.05$),地

下部生物量增量与 CK 差异不显著($P>0.05$),生物量增量分别比 CK 下降 25.81% 和 13.89%。说明,自然降温过程显著影响大花蕙兰幼苗地上部的生长,地下部比地上部表现出更强的耐寒能力。

表 1 自然降温过程中大花蕙兰不同器官的生物量增量

取样时间 Sampling date /年-月-日	地上部生物量增量 Biomass increment of overground plant/g	地下部生物量增量 Biomass increment of underground plant/g
2011-12-20(CK)	0.031 \pm 0.004a	0.036 \pm 0.008a
2011-12-31	0.026 \pm 0.002ab	0.033 \pm 0.005ab
2012-01-11	0.022 \pm 0.002b	0.027 \pm 0.002b
2012-01-22	0.023 \pm 0.003b	0.031 \pm 0.002ab

注:同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column show the significant difference at 0.05 level.

2.3 自然降温过程中大花蕙兰组培苗不同组织器官 MDA 含量差异

由图 2 可以看出,自然降温过程中叶随着降温时间的增长和强度的增加,MDA 含量上升幅度大于根,且各处理间呈极显著性差异。根 MDA 含量最大值比最小值高出 119.15%,小于叶的 136.14%,但仍达极显著差异。低温处理前后 MDA 含量均表现出叶高于根,随处理增加,二者差值逐渐增大。

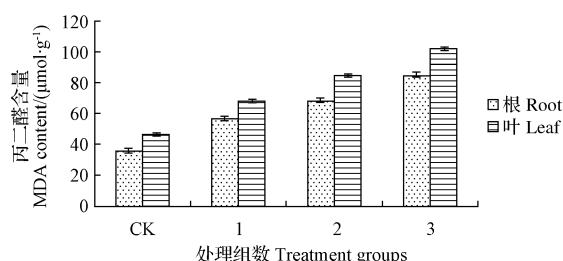


图 2 自然降温过程中大花蕙兰组培苗 MDA 含量

Fig.2 The content of MDA of *Cymbidium* plantlets in vitro in natural decreasing process of air temperature

2.4 自然降温过程中大花蕙兰组培苗不同组织器官可溶性糖含量差异

由图 3 可知,自然降温过程中各处理根可溶性糖含量高于叶,且处理 3 二者间差值最大,达 11.86 mg/g。随温度降低,根、叶可溶性糖含量均上升,但各处理间未达显著性差异。根在持续低温中,可溶性糖累积速度高于叶,处理间最值差异可达 27.23 mg/g,大于叶的 24.24 mg/g。

2.5 自然降温过程中大花蕙兰组培苗不同组织器官可溶性蛋白质含量差异

由图 4 可知,随温度降低大花蕙兰根、叶可溶性蛋白质含量梯度增加呈极显著性差异,且根含量极显著高于叶。温度最低时,根、叶可溶性蛋白质含量均为最大,

即 1.99 mg/g 和 0.36 mg/g。处理 3 叶、根含量差异极显著高于其它,达 1.63 mg/g。

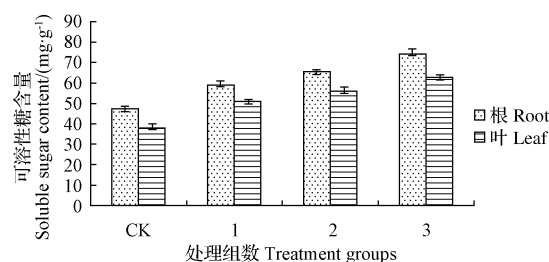


图 3 自然降温过程中大花蕙兰组培苗可溶性糖含量

Fig. 3 The content of soluble sugar of *Cymbidium plantlets* in vitro in natural decreasing process of air temperature

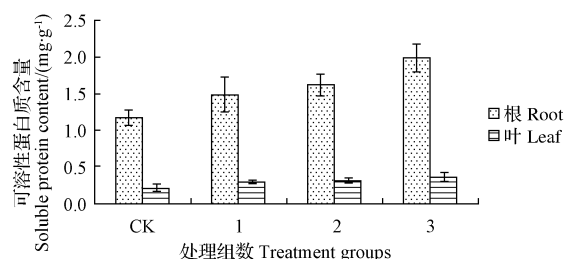


图 4 自然降温过程中大花蕙兰组培苗可溶性蛋白质含量

Fig. 4 The content of soluble protein of *Cymbidium plantlets* in vitro in natural decreasing process of air temperature

2.6 自然降温过程中大花蕙兰组培苗不同组织器官相对电导率差异

由图 5 可知,低温处理前后叶相对电导率均高于根,且处理间达极显著性差异。同其它测定值一样,处理 3 极显著高于其它处理,最值间差异根为 16.02 mg/g、叶为 20.98 mg/g。随温度降低,同处理间根、叶相对电导率差值呈非梯度增加;不同处理间,根或叶相对电导率数值呈梯度上升。

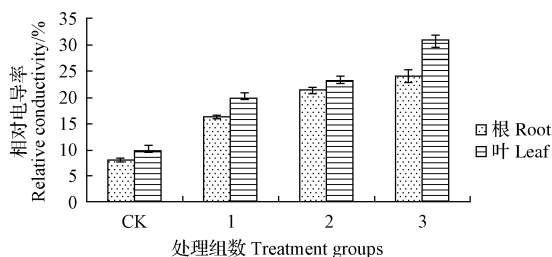


图 5 自然降温过程中大花蕙兰组培苗相对电导率含量

Fig. 5 The content of the relative electrical conductivity of *Cymbidium plantlets* in vitro in natural decreasing process of air temperature

2.7 自然降温过程中大花蕙兰组培苗抗氧化酶活性变化

由表 2 可知,随温度降低,三大酶活性均增强。抗

氧化酶活性在叶、根中表现存在差异,根中积累增加程度大于叶。POD 活性增量最大,根为 94.62%,叶为 86.25%,CAT 活性增量最小,根为 35.89%,叶为 33.86%。

表 2 自然降温过程中抗氧化酶活性变化

Table 2 Antioxidant enzyme activity change in natural decreasing process of air temperature

生化指标 Biochemical index	处理组数 Treatment groups	测定值 Measured value 根 Root	测定值 Measured value 叶 Leaf
超氧化物歧化酶活性 SOD activity (U · g ⁻¹ FW)	CK	61.23 ± 1.76Dd	37.78 ± 1.58Dd
	处理 1	71.68 ± 1.82Cc	47.05 ± 1.90Cc
	处理 2	79.37 ± 1.47Bb	52.19 ± 2.05Bb
	处理 3	97.42 ± 1.54Aa	59.31 ± 1.21Aa
过氧化物酶活性 POD activity (U · g ⁻¹ (FW) · min ⁻¹)	CK	11.72 ± 0.65Cc	8.22 ± 0.40Dc
	处理 1	17.77 ± 0.80Bb	12.39 ± 0.68Cb
	处理 2	19.02 ± 0.98Bb	14.07 ± 0.55Ba
	处理 3	22.81 ± 1.17Aa	15.31 ± 0.54Aa
过氧化氢酶活性 CAT activity (U · g ⁻¹ (FW) · min ⁻¹)	CK	16.83 ± 0.68Cc	11.93 ± 0.45Dc
	处理 1	19.45 ± 0.62Bbc	13.17 ± 0.58Cbc
	处理 2	20.89 ± 1.58ABab	14.45 ± 0.79Bab
	处理 3	22.87 ± 0.68Aa	15.97 ± 0.60Aa

3 结论与讨论

大花蕙兰耐寒性是其对寒害适应的一种遗传特性,不仅与其外界条件有关,而且取决于自身内部生理生化活动。大量研究证明,用丙二醛含量和可溶性糖含量、可溶性蛋白质含量、相对电导率、抗氧化酶活性等指标可直接衡量植物的抗寒性^[10-12]。该研究表明,以上几个参考指标与大花蕙兰耐寒性密切相关,随处理温度的下降,细胞内渗透调节物质含量及抗氧化酶活性逐渐上升。各指标对低温胁迫响应存在差异,与 CK 相比,增量百分比依次为 POD 活性>可溶性蛋白质含量>可溶性糖含量>SOD 活性>CAT 活性。可见,当大花蕙兰受到低温胁迫时,在酶类清除活性氧系统中,主要依靠 POD 清除 SOD 催化产生的 H₂O₂,从 POD 活性和 CAT 活性的变化趋势来看,POD 活性较 CK 变化大,说明当大花蕙兰受到低温胁迫时,由 POD 发挥主要先锋作用,将植物体内的 H₂O₂ 催化形成 O₂ 和 H₂O,POD 活性对低温胁迫的敏感性强于 CAT 活性。

低温胁迫对植物存在一个伤害阈值,当低于这个阈值时,植物能够正常生长。当超过这个阈值时,植物生长受阻^[13]。从生物量的测定结果可知,自然降温过程中,植物在受到低温胁迫时,短期内生长受限制,但在未达到低温伤害阈值时,其自身的抗性随着胁迫时间的延长而逐渐增强,此时低温对其造成的伤害可逆。同时,从叶和根表现出对低温的耐性来看,地上部生物量增量比 CK 下降 25.81%,达显著差异(P<0.05),而地下部在低温最后一天的生物量增量能够恢复至与 CK 差异不显著(P>0.05),各项生理指标的表现也可看出,大花蕙兰地下部比地上部表现出更强的耐寒性能。

参考文献

- [1] 张瑜. 大花蕙兰组培体系的建立及转耐寒基因 ICE1 的研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2007.
- [2] Wei Y Z,Zhou X B. Effect of application of neodymium on the growth and nutrition of *Brassica napus* L[J]. Materials Science Forum Mater,1999,315:348-353.
- [3] Shimasaki K,Tuneisi J,Fukumoto Y. The effect of benzyladenine,gibberellin and paclobutrazol organogenesis in *Cymbidium* species[J]. Journal of Society of High Technology in Agriculture,2002,14(1):44-48.
- [4] 刘园,王四清. 大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)的研究动向[J]. 园艺学报,2005,32(4):748-752.
- [5] 赵九洲,宛成刚,陈洁敏,等. 不同基质的水分亏缺对大花蕙兰生理生化特性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2003,27(2):29-32.
- [6] 赵伟,陈雅君,高阳,等. 白三叶品种组织结构与抗寒性的关系[J]. 草地学报,2008,16(3):234-238.
- [7] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [8] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社,1992.
- [9] 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,2003.
- [10] 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.
- [11] Patton A J,Cunningham S M,Volenec J J,et al. Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses;II. Carbohydrate and proline accumulation[J]. Crop Science,2007,47(5):2170-2181.
- [12] Ederli L,Reale L,Ferranti F,et al. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots[J]. Physiologia Plantarum,2004,121:66-74.
- [13] 王艳华,任传友,刘刚,等. 东北地区不同季节持续低温指数时空变化特征及其对区域温暖化的响应[J]. 资源科学,2013,35(5):1016-1023.

The Response of Different Organs of *Cymbidium hybridum* to Continuous Low Temperature Stress

TANG Min

(Chengdu Vocational College of Agricultural Science and Technology, Wenjiang, Sichuan 611130)

Abstract: Using the way of natural cooling process, seven indexes correlating with cold resistance including malondialdehyde (MDA) content, cell membrane permeability (CMP), soluble protein (SP) content, soluble sugar (SS) content, superoxide dismutase (SOD) activity, peroxidase (POD) activity and catalase (CAT) activity of aboveground and underground were monitored. The effects of low temperature stress on physiological characteristics of *Cymbidium hybridum* plantlets *in vitro* were determined and the capacity between aboveground and underground in improving cold-resistance for of *Cymbidium hybridum* were compared. The results showed that POD activity, soluble protein content and soluble sugar content significantly influenced the cold resistance and could be the indexes to identify the cold resistance in *Cymbidium hybridum* plantlets *in vitro*. The cold-resistance improvement of aboveground showed inconsistencies between different indexes to underground. The latter showed stronger ability of cold-resistance than the former.

Keywords: *Cymbidium hybridum*; plantlets *in vitro*; natural cooling process; cold-resistance

《北方园艺》常用计量单位表示法

常识

1. 时间:用 a(年)、d(天)、h(小时)、min(分)、s(秒)表示。
2. 面积:用 km²(平方千米)、hm²(公顷)、m²(平方米)、dm²(平方分米)、cm²(平方厘米),亩已废除,可暂用 667 m² 代替。
3. 质量:用 g(克)、kg(千克)、t(吨)表示。
4. 浓度:可用%表示质量分数和体积分数。质量浓度用 kg/L(千克每升)、g/L(克每升)、mg/L(毫克每升)、μg/L(微克每升)。ppm 已经不使用,可根据具体情况改写成质量分数 mg/kg、体积分数 μL/L 或质量浓度 mg/L,数值保持不变。
5. 组合单位

组合单位中不能加入其它信息,如“VC 含量 25 mg/100g 鲜重”,应为“VC 含量 250 mg/kg(鲜样质量)”。“施肥量 140 kg N/hm²”应为“施 N 肥量 140 kg/hm²”;组合单位书写错误,如“mg/kg·d”应为“mg·kg⁻¹·d⁻¹”。