

## 外源甜菜碱和氯化钙对提高假连翘耐寒性的生理机制

张永福<sup>1</sup>, 莫丽玲<sup>1</sup>, 牛燕芬<sup>1</sup>, 彭声静<sup>1</sup>, 王定康<sup>2</sup>, 耿开友<sup>2</sup>

(1. 昆明学院 农学院, 云南 昆明 650214; 2. 昆明学院 科研处, 云南 昆明 650214)

**摘要:**以园林绿化树种假连翘为试材,通过不同浓度的甜菜碱和氯化钙处理,测定在-3~6℃ 4个温度梯度下的叶片相对电导率、可溶性糖和脯氨酸含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性、氧自由基产生速率及过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量,综合评价各个药剂处理对假连翘耐寒性的影响。结果表明:8个处理的相对电导率、脯氨酸含量、POD活性随温度的降低而呈现不同程度的上升趋势,可溶性糖含量也基本随温度的下降而上升;各处理的SOD活性变化呈先升高后下降的趋势;除-3℃外,各处理的氧自由基产生速率和过氧化氢含量也呈先上升后下降的变化趋势;与8个处理耐寒性关系密切的生理指标为电导率、脯氨酸含量和氧自由基产生速率,通过隶属函数法综合评判得出,20 mmol/L 氯化钙和 20 mmol/L 甜菜碱+10 mmol/L 氯化钙处理对提高假连翘耐寒性的效果较好,研究为园林绿化管养提供了一定的理论指导。

**关键词:**假连翘;甜菜碱;氯化钙;低温胁迫;耐寒性;生理指标

**中图分类号:**S 567.7<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0154-06

假连翘(*Duranta repens* L.)属马鞭草科(Verbenaceae)植物,原产于中南美洲热带,从西印度群岛、墨西哥至巴西,世界各热带地区多有引种。我国云南和华南三省也有引种栽培,多用于园林绿化,其果可治疟疾,叶捣烂可敷治肿痛等<sup>[1]</sup>。近年来,随着城镇化发展及建设园林城市的需要,大量假连翘作为园林绿化树种被引入亚热带地区种植。假连翘四季常青、树形叶形多变,给城市带来更多的生机和活力,改变冬季景观单一、萧条的局面,在增强景观生态效应方面具有一定作用。但我国亚热带地区冬季常遭受阴雨乃至霜雪低温天气的侵袭,使假连翘常受到巨大的伤害。因此,探明假连翘的耐寒性及耐寒机制是亚热带地区园林工作者面临的一个重要课题。

甜菜碱广泛存在于生物细胞中,作为细胞内重要

的渗透调节物质,能有效维持低温下蛋白质和生物膜的结构和功能<sup>[2]</sup>。许多农作物在逆境胁迫下可合成并积累甜菜碱<sup>[3-4]</sup>,低温可诱发甜菜碱在植物体内的积累,植物抗寒力的强弱与低温下甜菜碱的增加量呈正相关<sup>[5-6]</sup>。钙作为植物细胞的第二信使,在植物对环境的反应和适应中起重要作用。在外界环境信号刺激下,细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度瞬时升高,结合并激活Ca<sup>2+</sup>的一个重要受体-钙调素(CaM),形成钙信号系统,改变蛋白激酶或蛋白磷酸化酶活性,调节相关基因表达,推动相应的生理生化反应<sup>[7]</sup>。在鹰嘴豆<sup>[8]</sup>、柠檬试管苗<sup>[9]</sup>和柑橘愈伤组织<sup>[10]</sup>上均有通过Ca<sup>2+</sup>处理提高抗寒性的报道。但甜菜碱和钙能否增强假连翘的耐寒性因各种化学药剂的性质和作用机制不同,多种药剂混合使用是否能够有效提高植物的耐寒性等研究均鲜见报道。为此,该研究选取热带园林树种假连翘为试材,先用不同浓度的甜菜碱和氯化钙处理,然后测定低温处理后的相对电导率、可溶性糖和游离脯氨酸含量、氧自由基产生速率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量、超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化物酶(POD)活性等耐寒生理生化指标,同时综合评价各种处理的耐寒性,以期今后热带树种在亚热带地区的引种栽培提供科学依据,寻找一种简单的方法来提高热带园林树种的耐寒性。

**第一作者简介:**张永福(1981-),男,博士,副教授,研究方向为植物抗性生理。E-mail:123017360@qq.com

**责任作者:**王定康(1966-)男,博士,教授,研究方向为植物生理及繁殖生物学。E-mail:wdk117@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31300302);云南省高校优势特色重点学科(生态学)建设资助项目;昆明学院引进人才科研资助项目(YJL11030)。

**收稿日期:**2015-12-18

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取昆明地区引种用于园林绿化的假连翘 3 年生盆栽扦插植株为试材,各株材料的长势和生长环境一致,采用水肥一体化管理,且各植株均健壮、无病虫害。

### 1.2 试验方法

试验于 2014 年 11 月进行,设置 8 个处理。T1 为喷施 10 mmol/L 甜菜碱, T2 为喷施 20 mmol/L 甜菜碱, T3 为喷施 40 mmol/L 甜菜碱, T4 为喷施 5 mmol/L 氯化钙, T5 为喷施 10 mmol/L 氯化钙, T6 为喷施 20 mmol/L 氯化钙, T7 为喷施 20 mmol/L 甜菜碱+10 mmol/L 氯化钙, CK 为喷施去离子水。每处理重复 5 个植株,每个植株的喷施量为 100 mL,以所有叶片均喷施到药剂且药液开始自然滴落为度,喷施时间为每天 17:00—18:00,连续喷施 5 d,停止喷药 2 d 后进行低温处理。低温处理的方法为把盆栽植株连同花盆一起放入光照培养箱中进行低温处理,每个处理分别放置于-3、0、3、6℃的光照培养箱中培养 12 h,对照为 25℃(室温),培养箱中光照强度为 4 000 lx,每天的光照时间为 16 h,黑暗时间为 8 h。低温处理完成后取出待恢复到室温后测定相关生理生化指标。

### 1.3 项目测定

1.3.1 相关指标测定 相对电导率的测定和计算参照李合生等<sup>[11]</sup>的方法,可溶性糖含量采用硫酸-苯酚法测定,游离脯氨酸含量采用酸性茚三酮显色法测定, SOD 活性采用氮蓝四唑法测定, POD 活性采用愈创木酚-双氧水显色法测定,氧自由基产生速率采用对氨基苯磺酸-α 萘胺比色法测定,过氧化氢含量采用丙酮提取法<sup>[11]</sup>。每个样品重复测定 3 次。

1.3.2 耐寒性的综合评价 应用隶属函数法分别计算 8 个处理中各指标的具体隶属值,并将各处理、各性状的耐寒隶属值进行累加,求出平均耐寒隶属值,综合评价不同处理对假连翘耐寒性的提高效果<sup>[12-13]</sup>。与耐寒性呈正相关的参数可溶性蛋白质含量、游离脯氨酸含量、可溶性糖含量、淀粉含量、SOD 活性、POD 活性的计算公式为  $X(\mu) = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$ ;与耐寒性呈负相关的参数相对电导率、氧自由基、过氧化氢的计算公式为  $X(\mu) = 1 - (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$ 。式中,  $X(\mu)$  为各指标的隶属度值,  $X_{\max}$  为所有处理中某一指标的最大值,  $X_{\min}$  为所有指标中某一指标的最小值。

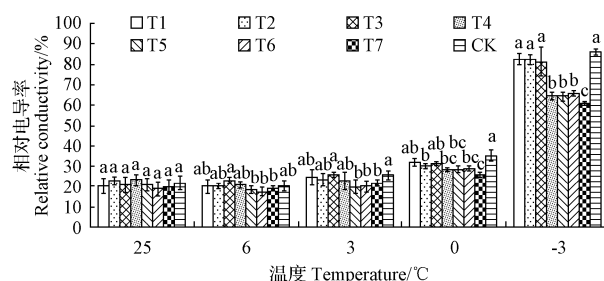
### 1.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行邓肯氏新复极差检验和各个生理指标的相关性分析,采用 Excel 2003 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜菜碱和氯化钙对假连翘叶片相对电导率的影响

由图 1 可知,除 25℃(室温)外不同处理对假连翘叶片相对电导率均有一定影响。在 25℃下各处理间均无显著性差异( $P < 0.05$ );与 25℃下相比,各处理的相对电导率在 6℃和 3℃下发生了一定的变化,其中 6℃时 T3 的相对电导率最大, T5、T6 和 T7 则较小,且显著低于 T3, 3℃时 CK 的相对电导率最大,同样 T5、T6 和 T7 较小,且显著低于 CK; 0℃时各处理的相对电导率均呈上升趋势,此时 CK 的相对电导率仍为最大,且除 T1 和 T3 外, CK 显著高于其余处理,此时相对电导率最低的是 T7,显著低于 T1、T2、T3 和 CK;从 0℃到-3℃,各处理的相对电导率均急剧上升,在-3℃时 T1、T2、T3 和 CK 的相对电导率显著高于 T4、T5、T6、T7,而 T7 则最低。



注:柱状图上不同小写字母表示通过 Duncan's 新复极差检测差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different small letters above the bars indicate significant difference at 5% level, according to Duncan's multiple range test.

图 1 甜菜碱和氯化钙对假连翘叶片相对电导率的影响

Fig. 1 Effect of betaine and calcium chloride on relative conductivity in *Duranta repens* leaf

### 2.2 甜菜碱和氯化钙对假连翘叶片可溶性糖和游离脯氨酸含量的影响

从表 1 可以看出,可溶性糖含量随温度的降低而总体呈上升趋势。总体上 T5 的可溶性糖含量在各个温度下均显著高于其它处理。25℃下 T5 和 CK 的可溶性糖含量显著高于其它处理,而 T6、T7 则显著低于除 T2 的其它处理;6℃时 T5、T7 和 CK 的含量显著高于其它处理,而 T2 则显著低于其它处理,此时 T7 的上升幅度最大;3℃与 0℃的情况相似,均为 T5、T6 含量显著高于其它处理,而 T2 低于其它处理;-3℃时 T4、T5 显著高于其它处理。

由表 1 还可知,尽管各处理的脯氨酸含量均呈上升趋势,但各自上升的幅度不同,25~-3℃, T1、T2、T3、T4 的含量均上升了约 100%,而 T5、T6、T7 和 CK 的上升幅度则相对较小。25℃下 T6、T7 的含量显著高于其它处理, T1 则显著低于除 T3 外的各处理;在-3℃时, T1、T4 的含量显著高于其它处理, CK 则显著低于其它处理。

表 1 甜菜碱和氯化钙对假连翘叶片可溶性糖和脯氨酸含量的影响

Table 1 Effect of betaine and calcium chloride on the contents of soluble sugar and proline in *Duranta repens* leaf

mg/gDW

处理 Treatment	可溶性糖含量 Soluble sugar content					脯氨酸含量 Proline content				
	25℃	6℃	3℃	0℃	-3℃	25℃	6℃	3℃	0℃	-3℃
T1	16.51b	17.87b	19.57c	21.60c	24.37b	0.78d	1.59a	1.69a	1.75a	1.85a
T2	14.68bc	14.38c	16.17d	18.60d	20.56c	0.90c	1.30b	1.35c	1.39c	1.81ab
T3	15.60b	16.19b	17.23d	19.45cd	21.71c	0.81cd	1.04c	1.18d	1.31c	1.72b
T4	15.85b	17.78b	20.96c	25.99b	28.07a	0.86c	1.24b	1.46b	1.52b	1.96a
T5	18.69a	20.81a	26.96a	29.01a	29.86a	1.01b	1.13bc	1.40bc	1.57b	1.68b
T6	13.95c	18.85ab	25.48a	27.99a	20.79c	1.56a	1.56a	1.62a	1.64b	1.67b
T7	13.34c	19.15a	22.04b	23.35b	23.33b	1.47a	1.54a	1.60a	1.61b	1.72b
CK	18.49a	19.62a	22.22b	22.14bc	21.97c	1.06b	1.19b	1.31c	1.32c	1.37c

注:表中同一列上不同字母表示通过 Duncan's 新复极差检测差异显著( $P<0.05$ ),下同。

Note: Different small letters in the same column indicate significant difference at 5% level, according to Duncan's multiple range test. The same as below.

## 2.3 甜菜碱和氯化钙对假连翘叶片 SOD、POD 活性的影响

表 2 表明,各处理的 SOD 活性随温度的降低而呈先上升后下降的趋势。相对而言,25℃下 T2、T3、T4、T5 的 SOD 活性显著高于 T6、T7 和 CK;T1、T2、T3 的 SOD 活性峰值出现在 6℃,T4 出现在 3℃,而 T5、T6、T7 和 CK 则出现在 0℃;-3℃时各处理的 SOD 活性均呈下降趋势,此时 T1、T2、T3、T4、T7 的活性显著高于其它处

理,而 CK 则显著低于其它处理。可见,甜菜碱和氯化钙均能提高假连翘 SOD 活性,但甜菜碱的效果优于氯化钙。此外,不同处理的 POD 活性随温度的降低而总体呈上升趋势,总体上 T5 的 POD 活性在各个温度下均较低,而 T2、T4 则在各温度下均保持较高的活性;25℃下 T1、T2、T4 的 POD 活性显著高于其它处理;6℃时,除 T5 外其它处理之间均无显著性差异;3℃时,T1 和 T5 均显著低于其它处理,而其它处理之间差异不显著。

表 2 甜菜碱和氯化钙复合处理对假连翘叶片 SOD 和 POD 活性的影响

Table 2 Effect of betaine and calcium chloride on the activities of SOD and POD in *Duranta repens* leaf

处理 Treatment	SOD 活性 SOD activity/(U · g <sup>-1</sup> FW)					POD 活性 POD activity/(U · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> FW)				
	25℃	6℃	3℃	0℃	-3℃	25℃	6℃	3℃	0℃	-3℃
T1	106.46ab	124.69a	116.13a	106.19b	105.12a	0.76a	0.76a	0.77b	0.81ab	0.83ab
T2	119.67a	124.76a	119.39a	115.88a	105.91a	0.82a	0.83a	0.89a	0.91a	0.96a
T3	117.96a	123.75a	120.13a	113.66a	106.16a	0.66b	0.79a	0.88a	0.95a	1.00a
T4	117.23a	115.39b	123.05a	118.16a	107.26a	0.84a	0.80a	0.84a	0.91a	0.93a
T5	113.18a	110.97ab	112.28a	116.13a	97.41b	0.66b	0.56b	0.74b	0.70b	0.61b
T6	91.97b	116.12a	115.33a	116.75a	91.78b	0.65b	0.76a	0.84a	0.92a	0.90a
T7	86.67b	108.12b	117.88a	122.73a	108.14a	0.64b	0.78a	0.83a	0.85ab	0.93a
CK	83.08b	105.93b	106.66b	118.23a	84.17c	0.56b	0.83a	0.85a	0.82ab	0.88ab

## 2.4 甜菜碱和氯化钙对假连翘叶片氧自由基产生速率和过氧化氢含量的影响

氧自由基和过氧化氢均属于活性氧物质,其在植物体内积累会导致植物的氧化损伤。由表 3 可知,25~0℃,各处理的氧自由基产生速率均随温度的降低而呈上升趋势,而 0~-3℃时 T1、T5、T6、T7 上升,其它处理则下降;在 25℃和 6℃时 T1、T2、T3 的

显著大于其它处理和 CK,而 25℃时 T3 又显著大于 T1、T2,可见甜菜碱处理后加剧了氧自由基的产生速率;在 0℃时,CK 的氧自由基产生速率显著大于其它处理,达 262.85  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{FW}$ ,而 T6 显著小于其它处理,仅 68.38  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{FW}$ ;在-3℃时,T6 显著大于其它处理,而 T7 则显著小于其它处理。

表 3 甜菜碱和氯化钙复合处理对假连翘叶片氧自由基产生速率和过氧化氢含量的影响

Table 3 Effect of betaine and calcium chloride on oxygen free radicals production rate and hydrogen peroxide content in *Duranta repens* leaf

处理 Treatment	氧自由基产生速率 Oxygen free radical generation rate/( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{FW}$ )					过氧化氢含量 Hydrogen peroxide content/( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ )				
	25℃	6℃	3℃	0℃	-3℃	25℃	6℃	3℃	0℃	-3℃
T1	113.89b	130.65a	179.86ab	198.91b	256.94b	48.44d	131.13bc	498.57a	711.79a	370.18d
T2	116.18b	129.48a	158.34b	166.59c	155.87cd	58.68d	160.36a	393.56c	476.40d	430.70c
T3	131.70a	141.01a	145.82b	153.06c	150.40d	75.03c	144.31b	397.84c	521.19c	435.59c
T4	71.03c	112.89b	199.26a	203.85b	169.63c	83.74c	177.63a	453.02b	729.67a	388.52d
T5	60.55cd	73.15c	151.46b	190.44b	245.30b	111.56b	120.43c	143.97e	176.52g	627.42a
T6	52.33d	57.80d	64.68d	68.38e	275.10a	149.96a	133.53b	157.45e	213.36f	495.20b
T7	58.33cd	81.61c	114.24c	117.70d	124.12e	123.75ab	158.72a	187.72d	249.62ef	423.06c
CK	55.33d	117.31b	124.89c	262.85a	257.67b	108.74b	165.78a	394.75c	675.11b	594.13a



从表 3 还可看出, T1、T2、T3、T4 的过氧化氢含量在 25~0℃, 随着温度的下降而急剧上升, 而从 0~-3℃ 则呈下降趋势; T5、T6、T7 和 CK 的含量则从 25~-3℃ 均随温度的下降而上升。25℃ 下, T6 的过氧化氢含量最高, T1、T2 的则最低; 各处理中, 在不同温度下过氧化氢含量的平均值最大是 CK, 然后依次是 T4、T1, 而 T5、T6 和 T7 则相对较小。可见, 喷施甜菜碱可有效降低 25℃ 下假连翘叶片的过氧化氢含量, 但在温度下降的过程中其含量则大幅度上升, 当温度下降到一定程度, 叶片遭受明显伤害后其含量又开始下降, 因此能够有效提高耐寒性的处理会使过氧化氢峰值出现的时间推迟。

表 4

低温胁迫下不同处理耐寒指标的隶属度值

Table 4

Subordination value of cold resistance indicator of different treatment under cold stress

处理	相对电导率	脯氨酸	可溶性糖	超氧化物歧化酶	过氧化物酶	氧自由基	过氧化氢	平均隶属度	耐寒位次
Treatment	Relative electrical conductivity	Proline	Soluble sugar	SOD	POD	Oxygen free radical	Hydrogen peroxide	Average of SF	Rate of cold resistance
T1	0.361	0.763	0.427	0.617	0.559	0.188	0.564	0.493	6
T2	0.327	0.377	0.045	0.854	0.940	0.385	0.554	0.497	5
T3	0.211	0.126	0.197	0.818	0.889	0.358	0.556	0.451	7
T4	0.497	0.498	0.591	0.825	0.843	0.421	0.345	0.574	4
T5	0.783	0.401	1.000	0.517	0.013	0.527	0.717	0.577	3
T6	0.883	0.813	0.515	0.454	0.735	0.800	0.656	0.694	1
T7	0.826	0.778	0.404	0.580	0.692	0.803	0.634	0.674	2
CK	0.178	0.182	0.562	0.146	0.675	0.383	0.299	0.346	8

### 3 讨论

低温胁迫造成植物细胞膜改变, 从正常的液晶态转变成凝胶态结构, 使细胞膜的类脂物凝固, 膜透性增加, 质膜内外离子平衡丧失, 离子渗漏而引起新陈代谢的异常。在正常情况下, 细胞内活性氧或自由基的产生与清除处于动态平衡, 不会伤害有机体; 但在低温胁迫下, 这种平衡被破坏, 过氧化反应产生新的自由基, 进一步促进膜脂过氧化, 膜的完整性受到破坏, 膜透性大幅度增大, 离子大量泄漏, 最终导致组织伤害或死亡<sup>[14]</sup>。这种变化的发生明显早于外部形态结构的变化, 因此膜透性可作为预测冷害的指标<sup>[15]</sup>。甜菜碱不仅是一种渗透调节物质, 还具有稳定膜系统的完整性、缓解氧化胁迫损伤等生理功能<sup>[4]</sup>。罗小敏等<sup>[16]</sup>报道, 黄瓜经甜菜碱处理后, 电解质在完整的细胞内部形成区域化分布, 达到渗透调节保护细胞膜的效果, 使细胞膜的透性降低, 但该研究却发现, 不同浓度的甜菜碱处理后, 在低温胁迫下并不能显著降低假连翘叶片的相对电导率。肖坤等<sup>[17]</sup>发现, 氯化钙处理能够使库尔勒香梨枝条的膜透性下降, 提高其抗寒性, 这与该研究结果相似。该研究还发现, 与 CK 和甜菜碱处理相比, 氯化钙能够显著降低假连翘叶片相对电导率, 此外二者复合处理后其相对电导率最低, 且差异显著。

低温胁迫下, 渗透调节物质的积累与冷害的关系密切。可溶性糖和脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质, 在细胞内积累后能降低其渗透势, 均衡原生质体内外的渗透强度, 减少细胞内可溶性蛋白质的沉淀<sup>[18]</sup>。渗

### 2.5 不同生理指标与相对电导率的相关性分析

由表 4 可知, 在低温胁迫下, 不同处理的各项指标对低温胁迫的响应差异较大, 单一指标不能完全反映耐寒性的强弱, 综合各指标判定 8 个处理的假连翘耐寒性的强弱顺序为 T6>T7>T5>T4>T2>T1>T3>CK。通过该研究得知, 电导率、脯氨酸含量和氧自由基产生速率与耐寒性关系密切, 可作为甜菜碱和氯化钙处理对提高耐寒性效果的指标。可见, 低温胁迫下, 甜菜碱和氯化钙处理均能够提高假连翘的耐寒性, 但氯化钙和复合处理的效果优于甜菜碱处理, 其中以喷施 20 mmol/L 氯化钙处理效果最佳。

透调节物质的积累是植物对低温胁迫所做出的适应性反应, 增强质膜稳定性, 提高细胞耐脱水能力<sup>[4,19]</sup>。因此, 一般认为渗透调节物质含量越高, 植物的耐寒性越强。该研究结果表明, 低温胁迫下, 各处理的可溶性糖含量均出现不同程度的上升, 说明假连翘叶片在受到低温胁迫时, 能产生较多的可溶性糖来保护机体, 减轻伤害程度, 但各处理并没有明显的差异, 因此可溶性糖含量不宜作为不同处理后假连翘耐寒性的鉴定指标。此外, 随着处理温度的降低, 假连翘叶片脯氨酸含量呈上升趋势, 在-3℃ 时, 各处理均明显提高了脯氨酸含量, 其中能产生较多脯氨酸的处理为 10、20 mmol/L 甜菜碱及 5 mmol/L 氯化钙。脯氨酸含量与假连翘耐寒性关系密切, 可作为甜菜碱和氯化钙处理后其耐寒性鉴定的生理指标, 这与鲁金星等<sup>[12]</sup>的研究结果不一致。

低温胁迫下, 植物体内积累大量的自由基, 导致膜脂过氧化水平提高, 膜脂成分改变, 不饱和指数下降, 膜透性增加, 结构和功能改变, 从而引发一系列生理生化变化。低温对植物体内不同酶系统的影响各异<sup>[20]</sup>, 植物受到冷害胁迫时, POD 能够与 SOD、过氧化氢酶(CAT)协同作用, 清除其体内产生的自由基, 使植物提高对低温胁迫的抵抗能力, 保护膜结构的完整性<sup>[21]</sup>, 但随着胁迫温度的进一步降低, 超出了植物的耐受范围而使细胞膜受损, 致使酶活性降低。低温胁迫能诱导 SOD 活性增加, 有效清除自由基<sup>[22]</sup>。张海英等<sup>[23]</sup>发现, 甜菜碱处理能够提高黄瓜组织 SOD 的活性, 加强对氧自由基的清除作用, 与丁天等<sup>[24]</sup>在辣椒上的研究结果一致。POD 是植物体内的一种保护酶, 其作用是清除生物体内不断

产生的自由基,维持代谢平衡,POD对各种不良环境十分敏感,其活性能够在一定程度上反映植物耐寒性的强弱。 $H_2O_2$ 不是自由基,但由于具有强氧化性,也会造成氧化伤害,而甜菜碱处理可有效减少 $H_2O_2$ 的积累<sup>[25]</sup>。该研究发现,低温胁迫下,各处理假连翘叶片的SOD、POD活性均呈上升趋势,其中在 $-3^{\circ}C$ 时,除10 mmol/L氯化钙处理外,其余处理均使这2个酶的活性显著上升。此外,还发现, $3\sim 0^{\circ}C$ 时,各处理的氧自由基产生速率和过氧化氢含量均随温度的降低而上升,但 $0\sim -3^{\circ}C$ 时,除10、20 mmol/L氯化钙和20 mmol/L甜菜碱+10 mmol/L氯化钙处理外,其余各处理的这2项指标均呈下降趋势,这一方面说明当温度从 $0^{\circ}C$ 降至 $-3^{\circ}C$ 时,假连翘叶片被严重冻坏,另一方面也说明上述3个处理对提高假连翘耐寒性的效果较好。

木本植物耐寒性是由许多数量性状控制的多基因综合作用累积的结果,每一个与耐寒性相关的性状对其耐寒性均起到一定的作用,但这种作用是微效的<sup>[26]</sup>。因此要判断不同处理对提高假连翘耐寒性的效果,需要综合评判各耐寒生理指标。单一指标具有片面性,通过对各生理指标进行数量化分析,得到综合指标的平均隶属度。该研究对8个处理假连翘的7项生理指标进行了隶属函数法综合分析,得出8个处理假连翘耐寒性的强弱顺序为 $T_6>T_7>T_5>T_4>T_2>T_1>T_3>CK$ , $0\sim -3^{\circ}C$ 是假连翘严重受伤甚至致死的温度,氯化钙单独处理及甜菜碱与氯化钙复合处理对提高假连翘耐寒性具有明显效果。因此,对于园林绿化工作者来说,掌握假连翘的耐寒性,并了解其对冬季低温响应的进程,在冬季有针对性的采用氯化钙或甜菜碱+氯化钙复合处理,对亚热带地区引种假连翘安全过冬具有实际指导意义。

### 参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志(第65卷第1分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 22.
- [2] RHODES D, HANSON A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio, 1993, 44: 357-384.
- [3] YANG W J, RICH P J, AXTELL J D. Genotypic variation for glycine betaine in *Sorghum*[J]. Crop Sci, 2003, 43: 162-169.
- [4] ASHRAF M, FOOLAD M R. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance[J]. Environ Exp Bot, 2007, 59: 206-216.
- [5] NAYYAR H, CHANDER K, KUMAR S. Glycine betaine mitigates cold stress damage in chickpea[J]. Agron Susta in Deve, 2005, 25(3): 381-388.
- [6] PARK W J, JEKNIC Z, TONY H. Exogenous application of glycine betaine in crease chilling tolerance in tomato plants[J]. Plant Cell Physio, 2006, 47(6): 706-714.
- [7] YANG T, POOVAIAH B W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants[J]. Trends in Plant Sci, 2003, 8(10): 505-512.
- [8] NAYYARRA H, BAINSB T S, KUMARA S. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage[J]. Environmental and Experimental Botany, 2005, 54: 275-285.
- [9] 张建霞, 李新国, 孙中海. 钙对柠檬试管苗生长和一些与抗寒性相关指标的影响[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 667-672.
- [10] 李新国, 张建霞, 孙中海.  $Ca^{2+}$ 信号系统对低温下柑橘膜脂过氧化和抗氧化酶的影响[J]. 广西植物, 2007, 27(4): 643-648.
- [11] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [12] 鲁金星, 姜寒玉, 李唯. 低温胁迫对砧木及酿酒葡萄枝条抗寒性的影响[J]. 果树学报, 2012, 29(6): 1040-1046.
- [13] 盛业龙, 王莎莎, 许美玲, 等. 应用隶属函数法综合评价不同烤烟品种苗期抗旱性[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1751-1758.
- [14] 王娟, 李德全. 逆境条件下植物体内渗透调节物质的积累与活性氧代谢[J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 459-465.
- [15] MANGANARIS G A, VASILAKAKIS M, DIAMANTIDIS G, et al. Cell wall cation composition and distribution in chilling-injured nectarine fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 37: 72-80.
- [16] 罗小敏, 张迎迎, 崔妍. 甜菜碱在植物抗渗透胁迫中的功能及其作用机制[J]. 河北林果研究, 2003, 18(4): 384-388.
- [17] 肖坤, 克热木·伊力, 王一静, 等.  $CaCl_2$ 处理对不同树龄库尔勒香梨提高抗寒性的研究[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(2): 241-249.
- [18] 丁灿, 杨清辉, 李富生, 等. 低温胁迫等对割手密和斑茅叶片游离脯氨酸含量的影响[J]. 热带作物学报, 2005, 26(4): 52-56.
- [19] 韩晋, 田世平. 外源茉莉酸甲酯对黄瓜采后冷害及生理化的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 289-293.
- [20] RUIZ J M, SANCHEZ E, GARCIA C, et al. Proline metabolism and NAD kinase activity in green bean plants subjected to cold-shock[J]. Phytochemistry, 2002, 59: 473-478.
- [21] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 92-99.
- [22] 尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 105-110.
- [23] 张海英, 王有年, 韩涛, 等. 外源甜菜碱对黄瓜果实冷藏期间延缓冷害的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2407-2412.
- [24] 丁天, 庞杰, 王清, 等. 外源甜菜碱对辣椒抗冷性的影响[J]. 广东农业科学, 2012(21): 52-55.
- [25] 王富贵, 韩涛, 张海英, 等. 外源甜菜碱处理对黄瓜冷藏期间活性氧代谢的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 313-316.
- [26] 肖祥希, 杨宗武, 叶忠华, 等. 福建柏与杉木、马尾松人工林木材性比较分析[J]. 林业科技通讯, 2000(2): 3-5.

## Physiological Mechanism of Exogenous Betaine and Calcium Chloride on Improving Cold Tolerance in *Duranta repens*

ZHANG Yongfu<sup>1</sup>, MO Liling<sup>1</sup>, NIU Yanfen<sup>1</sup>, PENG Shengjing<sup>1</sup>, WANG Dingkang<sup>2</sup>, GENG Kaiyou<sup>2</sup>

(1. School of Agriculture, Kunming University, Kunming, Yunnan 650214; 2. Office of Science Research, Kunming University, Kunming, Yunnan 650214)

# 新疆十种野生药用植物核型分析

牛 凯<sup>1</sup>, 许 正<sup>2</sup>, 丘佳丽<sup>1</sup>, 张力鹏<sup>1</sup>, 陈成彬<sup>1</sup>

(1. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071; 2. 新疆伊犁州园艺研究所, 新疆 伊宁 835000)

**摘 要:**以新疆伊犁新源县的 4 科 10 种药用植物为试材, 采用植物染色体标本制备的去壁低渗方法, 研究了染色体数目并进行了核型分析。结果表明: 大麻(*Cannabis sativa* L.)  $2n=20=12m+8sm$ 、苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)  $2n=36=26m+8sm+2st$ 、毛牛蒡(*Arctium tomentosum* Mill.)  $2n=36=6m+28sm+2st$ 、牛蒡(*Arctium lappa* L.)  $2n=36=8m+26sm+2st$ 、千叶蓍(*Achillea millefolium* L.)  $2n=36=26m+10sm$ 、牛至(*Origanum vulgare*)  $2n=30=12m+18sm$ 、菊苣(*Cichorium intybus* L.)  $2n=18=12m+6sm$ 、新疆鼠尾草(*Salvia deserta* Schang)  $2n=14=4m+10sm$ 、草原糙苏(*Phomis protensis* Kar)  $2n=22=12m+6sm+4st$ 、乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fish)  $2n=16=6m+10sm$ , 其染色体数目与前人报道一致。千叶蓍(*Achillea millefolium* L.)、牛至(*Origanum vulgare*)、新疆鼠尾草(*Salvia deserta* Schang) 3 种植物为首次报道。

**关键词:**新疆药用植物; 染色体; 去壁低渗法

**中图分类号:**R 282 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0159-05

新疆药用植物的资源丰富, 地产中草药品种颇多, 仅中草药原植物就达 2 014 种。中医药是我国民族医药的瑰宝, 越来越受到世界各国的重视, 正逐步走向世界, 但是我国大部分药用植物都是野生的, 其遗传背景和细胞学的研究甚少, 虽然有关药用植物染色体数目国内外学者做了大量的研究工作, 但对新疆产的药用植物细胞

学研究相对滞后, 近年来部分学者也开展了一些研究<sup>[1-3]</sup>。

现以 4 科 10 种采自新疆的药用植物为试验材料, 利用植物染色体标本制备的去壁低渗法, 对其染色体进行计数和核型分析, 以期对药用植物的遗传育种、分析种群间的关系、探索种群间进化发育和演化以及植物细胞分类学方面提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

10 种新疆药用植物材料大麻(*Cannabis sativa* L.)、苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)、毛牛蒡(*Arctium tomentosum* Mill.)、牛蒡(*Arctium lappa* L.)、千叶蓍

**第一作者简介:**牛凯(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传。E-mail: daxyueyaolan@163.com.

**责任作者:**陈成彬(1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物遗传学。E-mail: chenccb@nankai.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31371249)。

**收稿日期:**2016-01-07

**Abstract:** Taking the garden greening tree species *Duranta repens* as experimental material. Through different concentrations of betaine and calcium chloride treatment, relative conductance, the contents of soluble sugar and proline, the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), oxygen free radical generation rate and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content were investigated on four different temperature conditions from  $-3^{\circ}C$  to  $6^{\circ}C$ . The results showed that the relative conductance, proline content, POD activity of eight treatments increased to varying degrees with the lowering of the temperature. Overall change trend of the soluble sugar content also increased. The SOD of all treatments activity increased first and then declined. In addition to  $-3^{\circ}C$ , the oxygen free radical production rate and hydrogen peroxide content of each treatment also showed a trend of first increasing and then decreasing. The physiological indexes with close relation to the cold resistance of the eight treatments were relative conductance, proline content and oxygen free radical production rate. By the comprehensive evaluation with subordinate function, 20 mmol/L calcium chloride and 20 mmol/L betaine + 10 mmol/L calcium chloride treatments had the better effect on cold resistance of *Duranta repens* and the study for garden plant conservation could provide a theoretical guidance.

**Keywords:** *Duranta repens*; betaine; calcium chloride; low temperature stress; cold resistance; physiological index