

pH 胁迫下三种越橘组培苗的生理反应

李欣怡, 李加好, 韩占江

(塔里木大学 植物科学学院, 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以 3 个越橘品种“蓝丰”(高丛越橘)、“北陆”(半高丛越橘)和“园蓝”(兔眼越橘)为试验材料,采用植物组织培养技术,在 pH 5~9 的条件下胁迫 70 d 后,研究不同 pH 值对 3 种越橘组培苗呼吸速率、丙二醛含量和过氧化氢酶活性的影响。结果表明:3 种越橘组培苗的呼吸速率和过氧化氢酶活性均随 pH 值的增高而降低,丙二醛含量则随 pH 值的增高而升高。抗逆性综合评价结果显示,3 种越橘中,“园蓝”属于耐碱性品种,“北陆”属于较耐碱品种,“蓝丰”属于碱敏感品种。

关键词:越橘;植物组织培养;pH 胁迫;生理反应

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0107-05

越橘(*Vaccinium vitis-idaea* L.)属杜鹃花科越橘属多年生落叶、常绿的灌木或小灌木,又称越桔、蓝莓,全球共有 400 余种,我国现有 90 余种和 20 余亚种或变种,其中 10 余种的果实可供食用^[1-2]。越橘营养丰富,药用价值高,为联合国粮农组织(FAO)所列五大健康食品之一,食用越橘可延缓细胞衰老,减缓老年性疾病的发生,对癌症、心脏病、眼部疾病、记忆力减退等也具有较好的预防作用^[3-8]。目前市场上以越橘为原料的产品极为丰富,有鲜果、干果、果汁、果酒、罐头、果酱和化妆品等^[9]。我国的越橘研究工作起步较晚,目前已在生物学特征、良种选育与栽培技术、果实的采收与储藏加工等方面取得了一定进展^[10]。

由于越橘生长对土壤要求苛刻,喜疏松、有机质含量高的酸性土壤,限制了其栽培范围。适宜栽培的 pH 一般为 4.0~5.0,对碱性土壤较为敏感,而自然界中的土壤大多偏碱性,又加上改良土壤成本高,而且一旦土壤改造成酸性后,很难再回到原来的理化性质,也不宜再栽培其它的植物。因此,对耐碱性越橘品种的研究就显得十分迫切和重要。由于越橘生长周期长,完整植株

经济价值较高,因而利用大量整株试材进行耐碱性研究是比较困难的。采用离体培养技术进行植物抗逆性研究具有环境条件容易控制、操作简单以及节省土地和空间等优点而受到重视^[11]。该研究采用植物组织培养技术,在 pH 5~9 胁迫条件下对“蓝丰”、“北陆”、“园蓝”3 个品种试管苗的呼吸速率、丙二醛含量和过氧化氢酶活性进行分析,探讨 3 个越橘品种对中性、碱性环境的生理反应,旨在筛选耐碱性强的越橘品种,以期为耐碱越橘品种的培育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为“蓝丰”(‘Bluecrop’),“北陆”(‘Northland’),“园蓝”(‘Gardenblue’)3 个越橘品种,分别属于高丛越橘、半高丛越橘和兔眼越橘。在 7 月份取 2 年生生长状况良好、无病害、长势相似的枝条为接种材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理方法 用适量中性洗涤液浸洗 10 min,流水冲洗 20 min,12.5%(v/v)84 消毒液(主要成分为次氯酸钠,有效氯 4.5%~5.0%)处理 5 min,无菌水冲洗 5 次,之后剪成 2 cm 长茎段备用、接种^[12]。

1.2.2 培养基的制备 采用改良的 WPM+ZT 1.0 mg/L 培养基^[12],用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 在 pH 精密试纸上调整不同的 pH 值,分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,经 123℃ 高压灭菌 20 min 后,冷却备用。

1.2.3 接种和培养 在超净工作台上每瓶培养基接种 6 个茎段,每个处理设置 6 次重复。在组培室中采用光照强度 1 500~2 000 lx,温度(24±2)℃,光照 12 h/d 的条件下培养 70 d 左右。

第一作者简介:李欣怡(1988-),女,湖北荆门人,硕士,研究方向为作物生理。E-mail:xinyi565@163.com.

责任作者:韩占江(1979-),男,黑龙江绥化人,博士,副教授,现主要从事植物资源与抗逆生理等研究工作。E-mail:hanzhanjiang@126.com.

基金项目:新疆生产建设兵团“兵团英才”选拔培养工程(第一周期第三层次培养人选)资助项目;新疆生产建设兵团博士资金资助项目(2013BB008)。

收稿日期:2015-01-30

1.3 项目测定

呼吸速率测定采用小篮子法,过氧化氢酶活性测定采用高锰酸钾标准液滴定法,丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸法^[13]。各项生理指标的测定均重复3次。

1.4 数据分析

利用 Microsoft Excel 软件进行数据分析和作图,应用 SPSS 17.0 软件进行方差分析及 LSD 检验 ($P < 0.05$)。

抗逆性评价采用隶属函数法。隶属函数值通过以下方程计算: $X_1 = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$; $X_2 = 1 - (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$ 。其中, X 为3种越橘叶片材料某一生理指标的测定值, X_{\max} 为所有叶片测定该指标的最大值, X_{\min} 为所有叶片测定该指标的最小值。如果所测指标与抗逆性呈正相关关系时采用 X_1 值评价,反之,所测指标与抗逆性呈负相关关系时采用 X_2 评价。

2 结果与分析

2.1 pH胁迫下3种越橘叶片的呼吸速率比较

呼吸速率是植物体新陈代谢强弱的重要指标。由图1可知,随着pH值的增加,3种越橘叶片的呼吸速率均下降,“蓝丰”在pH 6时急剧下降,而“北陆”和“园蓝”在pH 8时才急剧下降。从单因素分析可以看出,在同一pH值下“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的呼吸速率也均存在显著差异。“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的呼吸速率平均值分别为 2.28 、 2.68 、 $3.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的呼吸速率和pH 5时相比,在pH 6时分别减少到 0.69% 、 0.89% 和 0.93% ,在pH 7时分别减少到 0.61% 、 0.79% 和 0.85% ,在pH 8时分别减少到 0.33% 、 0.32% 和 0.45% ,在pH 9时分别减少到 0.04% 、 0.04% 和 0.07% 。说明随着生长环境的碱性增强,3种越橘的新陈代谢均在逐渐减弱,在供试pH环境下“园蓝”的新陈代谢最强,受害程度最小,在高碱(pH 9)时3种越橘的受害程度都极大。

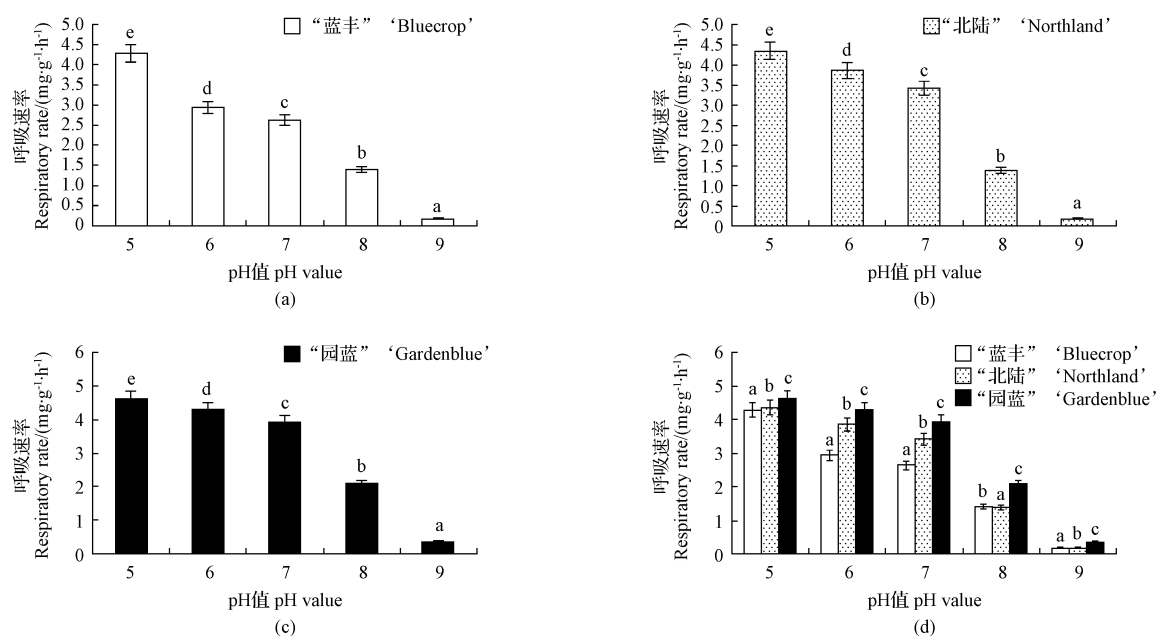


图1 pH胁迫对3种越橘叶片呼吸速率的影响

Fig. 1 Effect of pH stress on respiratory rate of three blueberry leaves

2.2 pH胁迫下3种越橘丙二醛(MDA)含量比较

MDA是膜脂过氧化的产物,对细胞膜有毒害作用,是最常用的膜脂过氧化指标。由图2可知,随着pH值的增加,3种越橘叶片的MDA含量均上升,“蓝丰”在pH 7时急剧上升,而“北陆”和“园蓝”在pH 6时就已经急剧上升。从单因素分析可以看出,“北陆”和“园蓝”在不同pH值间均存在显著差异,“蓝丰”在pH 7和pH 8时差异不显著。在同一pH值下“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的MDA含量均存在显著差异。“蓝丰”、“北陆”和

“园蓝”的MDA含量平均值分别为 0.26 、 0.21 、 $0.20 \mu\text{mol/g}$,“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的MDA含量和pH 5时相比,在pH 6时分别增加 1.08 、 1.32 、 1.70 倍,在pH 7时分别增加到 1.27 、 1.51 、 1.81 倍,在pH 8时分别增加到 1.27 、 1.59 、 1.89 倍,在pH 9时分别减少到 1.31 、 1.79 、 2.04 倍。说明随着生长环境的碱性增强,3种越橘的细胞膜受伤害程度均在逐渐加剧,各pH环境下“园蓝”的细胞膜受伤害最大,“蓝丰”的最小。

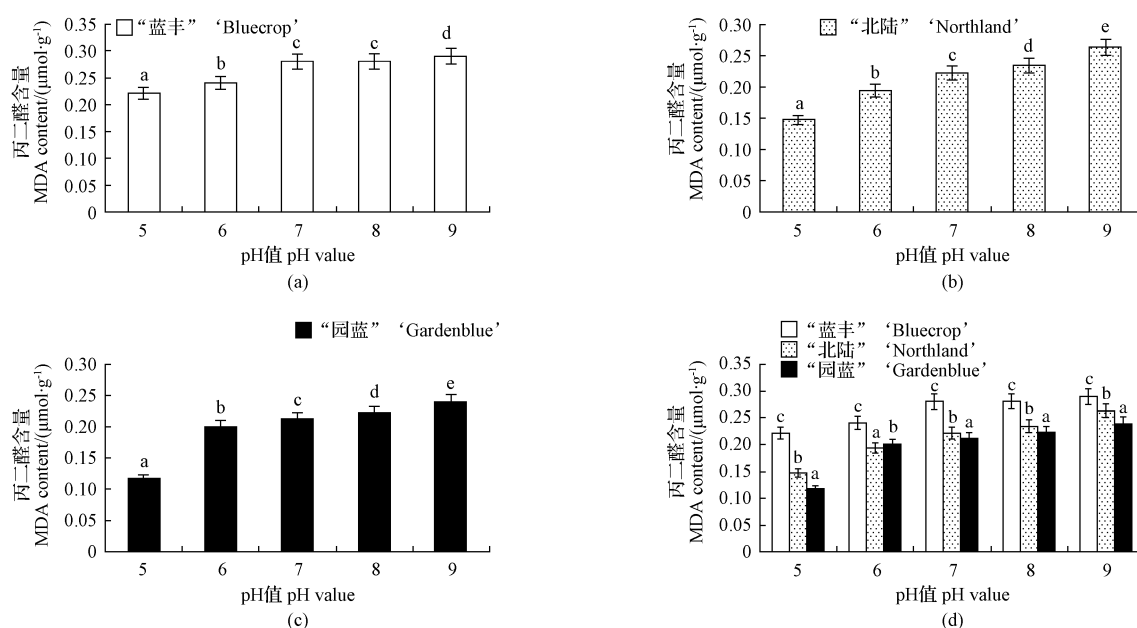


图2 pH胁迫对3种越橘叶片MDA含量的影响

Fig. 2 Effect of pH stress on MDA content of three blueberry leaves

2.3 pH胁迫下3种越橘叶片的过氧化氢酶(CAT)活性比较

CAT可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。由图3可知,随着pH值的增加,3种越橘叶片的CAT活性均下降,均在pH6时急剧下降。从单因素分析可以看出,3种越橘叶片的CAT活性在不同pH值间均存在显著差异。在同一pH值下“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的CAT活性均存在显著差异。

“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的CAT活性平均值分别为 0.61 、 0.79 、 $1.02 U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ ，“蓝丰”、“北陆”和“园蓝”的CAT活性和pH5时相比,在pH6时分别减少到 0.60% 、 0.71% 和 0.85% ,在pH7时分别减少到 0.22% 、 0.41% 和 0.58% ,在pH8时分别减少到 0.15% 、 0.20% 和 0.31% ,在pH9时分别减少到 0.07% 、 0.13% 和 0.16% 。说明随着生长环境的碱性增强,3种越橘的CAT活性均在逐渐减弱,各pH环境下“园蓝”的CAT活性最高,受害程度最小。

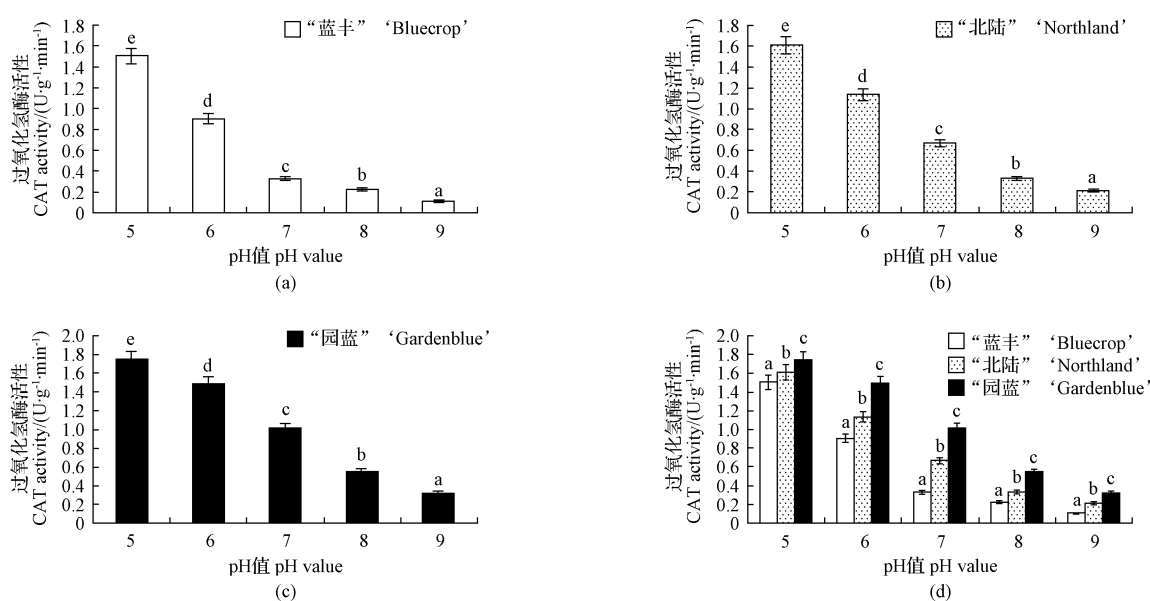


图3 pH胁迫对3种越橘叶片CAT活性的影响

Fig. 3 The effect of pH stress on CAT activity of three blueberry leaves

2.4 抗逆性综合评价

植物抗逆性是由多种因素共同决定,因而评价其抗逆性时要尽可能多考虑相关因素的影响。对3种越橘应用隶属函数评判法综合评价其抗逆性,能克服单个指标的片面性,能更好的反映3种越橘的抗逆能力。抗逆性隶属函数法是最为常用的抗逆性评价方法。

表 1

3 种越橘的耐碱性综合评价

Table 1

Comprehensive evaluation of alkali resistance of blueberry leaves

| 品种 Variety | 呼吸速率 Respiration rate | 丙二醛含量 MDA content | 过氧化氢酶活性 CAT activity | 综合抗逆性 Comprehensive resistance | 耐碱能力排序 Resistance sorting |
|------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| “蓝丰”“Bluecrop” | 0.47 | 0.16 | 0.31 | 0.31 | 3 |
| “北陆”“Northland” | 0.55 | 0.45 | 0.42 | 0.47 | 2 |
| “园蓝”“Gardenblue” | 0.65 | 0.53 | 0.56 | 0.58 | 1 |

3 讨论

越橘是一种美味的水果,营养丰富,具有广阔开发前景^[15-16]。越橘栽培作为一种劳动密集型产业,而我国因劳动力资源丰富、栽培土壤面积广阔故在越橘国际竞争中占有优势,但由于越橘对土壤的酸碱要求较高,pH胁迫对其影响较大,严重制约了越橘品种在我国碱性土壤地区的推广。研究表明,土壤pH值对越橘生长发育具有很大的影响^[17-20],pH值过高时越橘吸收铁元素能力较低而引起缺绿症,pH值过低时越橘叶片也容易枯萎^[20]。有研究发现越橘生长最适土壤pH为4.0~5.0,低于或高于此范围均不利于越橘生长,严重的甚至死亡^[21];也有研究表明,不同品种越橘的适宜pH范围略有不同^[18,20,22-25]。

该研究结果显示,以“园蓝”为代表的兔眼越橘对耐碱的抗逆性最强,半高丛越橘“北陆”属于较耐碱性品种,高丛越橘“蓝丰”为喜酸性品种,对碱环境适应最弱。在我国碱性土壤中,可以种植兔眼越橘为主,在投入资本少的改良土壤中以种植兔眼越橘和半高丛越橘为主,在酸性土壤中以种植高丛越橘为主,可取得较好的产量和资本回收。

参考文献

- [1] 李丽敏,吴林.中国蓝莓产业发展研究[M].北京:中国农业出版社,2011.
- [2] 李亚东,张志东,吴林,等.越橘(蓝莓)栽培与加工利用[M].长春:吉林科学技术出版社,2001.
- [3] BILLING S C, CHIN C K, JELENKOVIC G. Regeneration of blueberry plantlets from leaf segments[J]. Hort Science, 1988, 23(4): 763-766.
- [4] GORDILLO A M, SASHWATI G R. Antiangiogenic proerty of edible berry in a model of hemangiam[J]. Febs Letters, 2003, 544(1): 152-258.
- [5] DEBNATH S C. Effects of earth on source and concentration on development of lingonberry (*Vaccinium vitisidaea* L.) shoots cultivated *in vitro* from nodal explants[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2005, 41(2): 145-150.

求取各抗逆指标隶属函数值的平均值。平均值越大,抗逆性越强,配合恰当的抗逆指标,就能较为准确地评定树种或品种间抗逆性的强弱^[14]。从表1可以看出,3种越橘耐碱能力表现为“园蓝”最强,“北陆”其次,“蓝丰”最弱。说明“园蓝”对碱性环境具有更高的适应性。

- [6] 方瑞征.中国越桔属的研究[J].云南植物研究,1986,8(3):239-258.
- [7] PAYNE T J. Formulating with blueberries for health[J]. Cereal Foods World, 2005, 50(5): 262-264.
- [8] MARION B R. Building a better blueberry[J]. Agricultural Research, 2002, 509(11): 11.
- [9] 李丽敏,吴林,郝庆升,等.中国蓝莓市场现状及产业发展对策研究[J].中国果树,2013(3):70-73.
- [10] 唐少勋,刘海广,张友民.越橘研究进展[J].北方园艺,2012(6):192-193.
- [11] 牛爱国,张开春,阎国华,等.樱桃砧木酸碱盐适应性评价[J].果树学报,2004,21(5):482-484.
- [12] 张志东,杨瑞芹,李亚东,等.蔓越橘茎段离体培养[J].东北农业大学学报,2013,44(7):117-122.
- [13] 潘瑞炽.植物生理学(第7版)[M].北京:高等教育出版社,2012.
- [14] Herbert T J, Larsen P B. Leaf movement in *Calathea lutea* [J]. Marantaceae Oecologia, 1985, 67: 238-500.
- [15] 唐雪东.黑土土壤环境优化对越橘生长发育的影响及其生理机制[D].长春:吉林农业大学,2003.
- [16] 李亚东,吴林,刘洪章,等.越橘果实中营养成分分析[J].北方园艺,1996(3):22-23.
- [17] 王斌,徐守霞,赵志东.土壤酸碱环境对蓝莓花色苷积累的影响研究[J].广东农业科学,2010(1):45-48.
- [18] 李亚东,陈伟,张志东,等.土壤pH值对越桔幼苗生长及元素吸收的影响[J].吉林农业大学学报,1994,16(3):51-54.
- [19] 徐璐,郑建仙.欧洲越桔花色苷的研究概况[J].中国食品添加剂,2005(4):43-46.
- [20] 周琳,徐海军,李静,等.土壤pH值对蓝莓幼苗生长发育的影响[J].国土与自然资源研究,2010(1):91-92.
- [21] 迟峰,丁文芹.丹东地区蓝莓栽培技术要点[J].辽宁林业科技,2008,8(3):52-53.
- [22] NORMAN F C, PAUL M L. Blueberries for growers, gardeners and promoters[M]. Painter Printing Company, 2006: 60-74.
- [23] ECK P. Blueberries[M]. New Jersey: Rutgers University Press, 1988.
- [24] 唐雪东,李亚东,臧俊华,等.土壤施硫对越桔生长发育的影响[J].东北农业大学学报,2004,35(5):553-560.
- [25] AUSTIN M E, GAINES T P, MOSS R E. Influence of soil pH on soil nutrients, leaf elements and yield of young rabbit-eye blueberries[J]. Hort Science, 1986, 21: 443-445.

连瓣兰组织培养及菌根化研究

段雪甜^{1,2}, 陈雨薇^{1,2}, 王芳¹, 李婷婷², 伍建榕^{1,2}

(1. 西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学 林学院, 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:以野生连瓣兰和组培连瓣兰为试材,采用内生真菌分离鉴定、内生真菌与连瓣兰组培苗的共生培养以及制作石蜡切片对其菌根结构进行观察等方法,研究菌根真菌对连瓣兰生长的影响,并找出适合连瓣兰生长的菌根真菌。结果表明:从保山野外采集的12株连瓣兰中分离得到的10个菌株中,有3株适合与组培苗进行共生培养,分别是丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)、毛壳菌属(*Chaetomium* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.),其中丝核菌效果最佳,对无菌组培苗生长有良好的促进作用并在无菌组培苗根部形成菌丝结。

关键词:连瓣兰;组织培养;菌根真菌;共生培养;菌根化

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0111-03

兰科(Orchidaceae)植物俗称兰花,全世界约有700属20000多种及大量变种,主要分布于热带、亚热带和

温带地区,尤其南美洲和亚洲的热带地区为多^[1]。连瓣兰(*Cymbidium lianpan*)属兰科兰属(*Cymbidium*),是中国兰花中栽培历史最为悠久、人们最为喜欢的种类之一,但它也是繁殖最为困难的种之一。再加上长期无节制的乱采滥挖,野生资源已枯竭,现在不仅已列入国家的珍惜濒危植物加以保护而且还收载于国际贸易公约(CITES)附录二中,受到国际保护^[2]。采用组织培养技术进行规模化生产可获得大量优质种苗,对其繁殖有一定的参考价值。现阶段我国兰花组织培养技术已日趋成熟,但组培苗移栽时成活率低、生长缓慢,很难大面积推广,其主要原因在于兰花在短期内无法与相关的真菌形成菌根^[3]。

在自然条件下,内生菌根的形成对兰花来说是必不

第一作者简介:段雪甜(1992-),女,云南保山人,硕士研究生,研究方向为资源微生物学。E-mail:864230585@qq.com.

责任作者:伍建榕(1963-),女,福建清流人,博士,教授,现主要从事森林病理学和资源微生物利用等研究工作。E-mail:wujianrong63@aliyun.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360198、31260175);云南省教育厅科学研究基金资助项目(2013Y123);云南省高校干热河谷植被恢复创新团队资助项目;云南省重点学科森林保护学资助项目(XKZ200905);云南省高等学校森林病虫害综合治理教学团队资助项目(20126005)。

收稿日期:2015-05-28

Effect of pH Stress on Physiological Responses of Three Tissue Culture Seedlings in Blueberry

LI Xinyi, LI Jiahao, HAN Zhanjiang

(College of Plant Science, Tarim University, Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: The respiration rate, MDA content, CAT activity changes of 'Bluecrop' (*Vaccinium corymbosum*), 'Northland' (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium chamaebuxus*) and 'Gardenblue' (*Vaccinium ashei*) were investigated after growing for 70 days with pH stress from 5 to 9 by the plant tissue culture technique. The results showed that respiration rate and CAT activity of three blueberries reduced with pH value increasing while MDA content increased. The comprehensive evaluation results showed that 'Bluecrop' belonged to the most alkaline resistant variety, 'Northland' belonged to more alkaline resistant variety and 'Gardenblue' belonged to alkaline sensitive variety.

Keywords: blueberry; plant tissue culture; pH stress; physiological response