

低温胁迫对“琉球红”杜鹃生理特性的影响

明萌^{1,2}, 何静雯^{1,2}, 卢丹², 谢晓鸿², 吴月燕^{2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

摘要 [目的]研究“琉球红”对低温的耐受能力。[方法]试验采用盆栽方法,以“琉球红”杜鹃为试验材料,研究了“琉球红”杜鹃叶片中3种保护酶活性[过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)]、相对电导率、丙二醛(MDA)含量、可溶性蛋白含量等理化指标,在0、-3和-6℃(T₁、T₂和T₃)低温条件下,处理1、2、3、4、5、6d时的变化情况。[结果]在低温胁迫下“琉球红”杜鹃叶片中MDA含量,可溶性蛋白含量,及“琉球红”杜鹃叶片保护酶CAT、POD和SOD活性先升高,且在低温胁迫4d时,MDA含量、可溶性蛋白含量和酶活性达到最高,随着低温胁迫时间的增加,MDA含量、可溶性蛋白含量和保护酶活性开始下降,在低温胁迫6d时达到最低,且杜鹃叶片出现轻微萎蔫情况与对照变化较为明显。试验证明“琉球红”杜鹃在-6℃低温胁迫3d内保持着正常的生理指标,在低温胁迫3d后,包括外部形态特征、保护酶活性均发生较明显变化。在低温胁迫下“琉球红”杜鹃通过提高保护酶活性及可溶性蛋白含量等,减少了活性氧(ROS)的积累和膜脂过氧化产物的产生,增强了“琉球红”杜鹃耐低温胁迫的能力,但是随着低温胁迫时间的增加,植物细胞受到不可逆的破坏,导致抗氧化酶活性下降,试验表明,“琉球红”杜鹃能耐受的较低温度为-3℃。[结论]该研究可为宁波及周边城市将“琉球红”作为绿化植物提供参考。

关键词 低温胁迫;杜鹃;生理指标;抗氧化系统

中图分类号 S685.21 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)23-0029-03

Effects of Low Temperature Stress on the Physiological Characteristics of *Rhododendron hybridum* “Liuqihong”

MING Meng^{1,2}, HE Jing-wen^{1,2}, LU Dan², WU Yue-yan^{2*} et al (1 College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2 College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100)

Abstract [Objective] In order to study the tolerance of “Liuqihong” to low temperature. [Method] By pot experiment with *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” as experimental material, studied the changes of 3 kinds of antioxidant enzymes in the leaves of *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” (CAT, POD and SOD), relative conductivity, malondialdehyde (MDA) content, soluble protein content, under 0℃, -3℃ and -6℃ (T₁, T₂ and T₃) low temperature conditions for 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d. [Result] Under low temperature stress, *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” in the leaves of (MDA) content, soluble protein content, and *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” leaf antioxidant enzymes CAT, POD and SOD activity increased at first, and MDA content, soluble protein content and enzyme activity was the highest after low temperature stress for 4 days. With the increase of low temperature stress time, MDA content, the soluble protein content and enzyme activity declined firstly, reached the lowest point after cold stress 6d, and slight wilting in *Rhododendron hybridum* and control more obvious changes. The results showed that the *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” maintained normal physiological indexes in the -6℃ low temperature stress 3 d, and the changes of the external morphological characteristics, antioxidant enzyme activities were significantly changed after chilling stress in 3 d. Under low temperature stress *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” by improving antioxidant enzyme activity, antioxidant content and soluble protein content, reduced the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation products, enhanced the ability of resistance to low temperature stress, but with the increase of stress time, plant cells were irreversibly damaged, resulting in antioxidant enzyme activity concentration decreased. The experiment showed that the lower temperature of the “Liuqihong” *Rhododendron hybridum* can be tolerated was -3℃. [Conclusion] The research can give reference for using “Liuqihong” as a green plant in Ningbo and surrounding cities.

Key words Low temperature stress; *Rhododendron hybridum*; Physiological index; Antioxidant system

杜鹃花(*Rhododendron*), 是杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron* L.), 常绿或落叶灌木, 是世界盆栽花卉生产的主要种类之一^[1-2]。低温胁迫是植物栽培中经常遇到的一种灾害, 低温会影响植物生长代谢以及地理分布, 并会给生产带来严重损失^[3], 尤其杜鹃为浙江省宁波市重要的绿化植物, 但能应用于园林绿化的品种较单一, 花色较为单调, “琉球红”作为花色艳丽、花期较长的品种, 对其进行耐低温的研究尤为重要。通过探讨不同低温下“琉球红”杜鹃的胁迫反应, 对该品种的抗寒性进行系统地评价, 旨在为今后杜鹃优良品种作为园艺和绿化材料在宁波及环境相似地区的筛选和推广提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于宁波市北仑区柴桥镇万景杜鹃

基金项目 宁波市重大科技专项(2014C11002); 浙江省重中之重学科“生物工程”开放基金(KF2015008)。
作者简介 明萌(1991—), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向: 园林植物耐寒生理生化。* 通讯作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事植物营养生理与品质调控、植物化学与分子生物学研究。

收稿日期 2017-05-24

园, 为36株生长状况相近、株高相似的成熟“琉球红”杜鹃。

1.2 试验方法 试验于2016年9—11月在浙江万里学院植物生理与分子改良实验室内进行, 每盆定植1株, 设置3个温度水平0℃(T₁)、-3℃(T₂)、-6℃(T₃)进行人工低温胁迫, 在以25℃(CK)为对照, 对照和每个处理均选取3盆, 重复3次, 常规管理。将杜鹃放入低温生化培养箱, 对照各处理空气相对湿度为70%~80%, 光照/黑暗处理为12h/12h^[4], 光强为216 μmol/(m²·s), 共处理6d, 在处理期间适时补充水分, 保持土壤湿润, 并在低温处理的1、2、3、4、5、6d时分别随机取样, 采样时各处理和对照随机选取杜鹃的中部功能叶片, 置于-80℃超低温冰箱或液氮中保存, 并观察各处理与对照植株和叶片的形态特征, 之后分别测定杜鹃叶片的丙二醛(MDA)含量、可溶性蛋白含量、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以上各指标均随机取样, 重复3次进行测定。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 叶片形态特征的观测。 观测各处理和对照的“琉球红”杜鹃, 每株随机选择5根枝条, 统计每根枝条的叶片数,

重复3次,记录各处理的叶片数平均值。根据记录的生长情况,进行综合评定。

1.3.2 抗氧化酶活性测定。可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝法^[5];MDA采用硫代巴比妥酸法^[6];SOD测定采用NBT光化还原法^[7];POD活力测定采用愈创木酚法^[7];CAT测定采用紫外吸收法^[8],以上测定值,均取3次测定的平均值。

1.4 统计分析方法 试验数据运用 Excel 和 Prism 5.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下“琉球红”杜鹃叶片形态的变化 如表1和图1所示,不同低温胁迫时间下,杜鹃叶片形态发生变化。CK、T₁、T₂叶片基本都为绿色,叶片基本无卷曲萎蔫,无脱落现象。T₃叶片在低温胁迫1d后仍保持绿色,无卷曲萎蔫,且无脱落,但在低温胁迫2d后叶片颜色开始变深,出现轻微的卷曲萎蔫,至第5、6天叶片出现脱落情况但不严重。

2.2 低温胁迫对“琉球红”杜鹃理化特性的影响

2.2.1 低温胁迫对“琉球红”杜鹃MDA的影响。MDA含量随着低温胁迫程度的加强而升高,与细胞膜透性呈正相关,与植物的抗寒性呈负相关^[9]。因此,MDA积累越多说明植物受胁迫伤害越重,抗性越差。如图2所示,T₁、T₂和T₃“琉球红”杜鹃叶片中丙二醛的含量在低温胁迫下呈上升趋势,且在第5、6天时达到最大值,T₁与CK变化不显著($P > 0.05$),T₂和T₃变化较显著($P < 0.05$),这表明,随着低温胁迫程度的增强和胁迫时间的增加,丙二醛含量升高,杜鹃细胞遭到破坏,致使杜鹃叶片内部结构破损。

表1 低温胁迫下“琉球红”杜鹃叶片形态的变化

Table 1 Changes in leaf morphology of *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” under low temperature stress

处理 Treatment	处理天数 Treatment days//d	叶片颜色 Leaf color	叶片形状 Leaf shape	叶片脱落情况 Leaf abscission
CK	1	绿色	无卷曲萎蔫	无
	2	绿色	无卷曲萎蔫	无
	3	绿色	无卷曲萎蔫	无
	4	绿色	无卷曲萎蔫	无
	5	绿色	无卷曲萎蔫	无
	6	绿色	无卷曲萎蔫	无
T ₁	1	绿色	无卷曲萎蔫	无
	2	绿色	无卷曲萎蔫	无
	3	绿色	无卷曲萎蔫	无
	4	绿色	无卷曲萎蔫	无
	5	绿色	无卷曲萎蔫	无
	6	绿色	无卷曲萎蔫	无
T ₂	1	绿色	无卷曲萎蔫	无
	2	绿色	无卷曲萎蔫	无
	3	绿色	无卷曲萎蔫	无
	4	绿色	无卷曲萎蔫	无
	5	深绿	无卷曲萎蔫	无
	6	深绿	无卷曲萎蔫	无
T ₃	1	绿色	无卷曲萎蔫	无
	2	深绿	无卷曲萎蔫	无
	3	深绿	少量无卷曲萎蔫	无
	4	深绿	少量无卷曲萎蔫	无
	5	浅褐	少量无卷曲萎蔫	少量
	6	浅褐	部分无卷曲萎蔫	少量



图1 低温胁迫下“琉球红”杜鹃的外观形态

Fig.1 Appearance of *Rhododendron hybridum* “Liuqihong” after different intensity treatment of low temperature

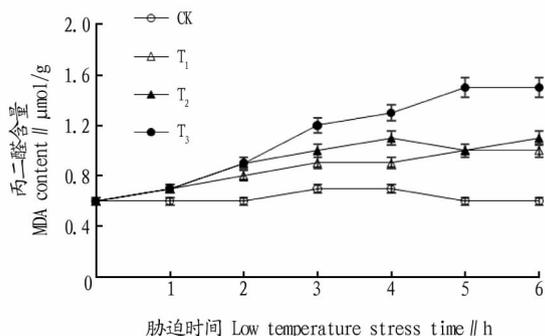


图2 低温胁迫对丙二醛含量的影响

Fig.2 Effect of low temperature stress on MDA content

2.2.2 可溶性蛋白含量的变化。在一定的胁迫条件下,植物体内蛋白质含量的提高是植物对逆境胁迫适应的一种表现,可作为植物相对抗性的一种指标^[10]。如图3所示,CK体内蛋白质含量趋于稳定,在低温胁迫下T₁体内蛋白质含量变化不显著($P > 0.05$),T₂和T₃体内蛋白质含量开始上升,且在胁迫第3天达到最大值,之后杜鹃叶片中可溶性蛋白含量开始下降,T₂变化不显著($P > 0.05$),T₃变化显著($P < 0.05$)。这表明,在低温胁迫下,杜鹃通过增加可溶性蛋白的含量来提高对低温的抗性,T₂和T₃在低温胁迫3d后,可溶性蛋白含量开始降低,可能是长时间的低温胁迫下,细胞内部遭到一系列不可逆的破坏,致使其细胞损坏,抑制了蛋白

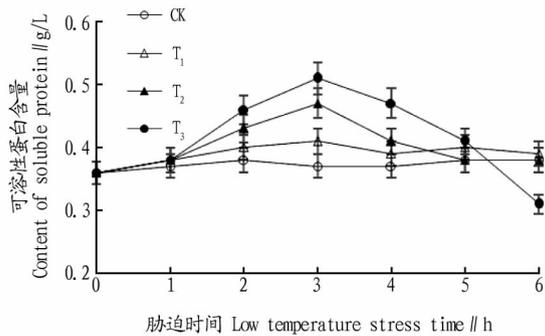


图3 低温胁迫对可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Effect of low temperature stress on soluble protein content

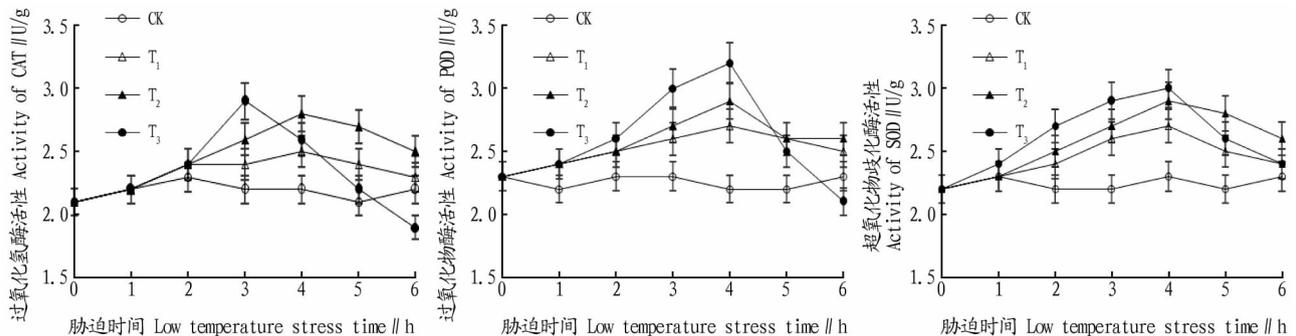


图4 低温胁迫对抗氧化酶活性的影响

Fig.4 Effect of low temperature stress on antioxidant enzyme activities

3 结论与讨论

早期研究发现,在低温胁迫下,植物正常代谢失衡,MDA含量提高,保护酶活性增大,可以通过保护酶活性的提升增强对低温的抵御能力,同时叶片的渗透调节能力也失衡,可以靠提高可溶性物质含量来增强抗寒性。温度越低,保护酶活性和可溶性物质的含量越高^[12]。-6℃条件下进行人工低温胁迫,杜鹃“琉球红”新陈代谢严重失衡,植物细胞受到的伤害无法恢复。

在该试验研究中,杜鹃“琉球红”品种,在低温胁迫下,MDA的含量呈不断上升趋势,其是细胞膜脂过氧化的重要产物,它会使植物细胞的生物膜受到损伤,这与前人研究的结果一致^[13-14]。SOD活性的提高催化了超氧阴离子自由基的歧化作用,形成分子氧和过氧化氢,POD和CAT活性的提高能有效地清除植物体内的过氧化氢。0、-3、-6℃人工低温胁迫下,SOD、POD和CAT均呈先上升后下降趋势,表明杜鹃是通过增加抗氧化酶的活性来抵抗外界低温环境,但随着低温胁迫时间和程度的增加,杜鹃的新陈代谢严重失衡,其受到的伤害需要较长的时间恢复甚至无法恢复^[15-16]。可溶性蛋白质参与植物细胞内渗透势的调控,为细胞活动提供能量并传递相关信息,在植物抵抗逆境胁迫的过程中起到关键作用。试验结果表明,低温胁迫开始时,可溶性蛋白含量逐渐升高,随着低温胁迫程度和时间的增加,其含量开始下降。开始可溶性蛋白含量的增加,可能是由于低温促进了相关保护酶的合成,保护酶的增加使得杜鹃对低温的抗性增加。刚开始可溶性蛋白含量的增加也可能是某些大分子蛋白的

质的合成。

2.2.3 保护酶活性的变化。CAT、POD、SOD是生物体内重要的保护酶,在消除超氧化物自由基、减轻脂质过氧化作用和膜伤害方面起重要作用^[11]。由图4可知,CK和T₁的保护酶活性变化不显著,T₁基本呈平缓的先上升后下降的趋势,T₂和T₃在低温胁迫下保护酶活性总体趋势先上升后下降,SOD变化不显著($P > 0.05$),且CAT和POD变化较为明显($P < 0.05$),保护酶活性在低温胁迫第4天左右达到最高值。这表明,在低温胁迫下,杜鹃通过增加保护酶的活性来抵抗外界低温环境,而抗氧化酶的活性在5d后呈下降趋势,可能是因为长时间的低温胁迫,杜鹃体内细胞遭到破坏,保护酶的合成受到阻碍。

解所导致的,但是,由于低温胁迫程度和时间的增加,蛋白质遭到破坏,并以氨基酸的形式而存在,在不断低温胁迫下,蛋白质的相关合成酶系统受损,也可能导致可溶性蛋白含量的下降,与前人研究的结果一致^[17-19]。综上所述,可溶性蛋白的含量与“琉球红”杜鹃抗寒性之间有必然的联系。

综上所述,在该试验中,杜鹃在低温胁迫下,其生理生化变化规律明显:在长时间的低温胁迫下,叶片会由绿色变为褐色,出现落叶情况,枝干颜色加深。MDA含量、可溶性蛋白含量、POD、SOD和CAT酶的活性出现规律性变化。因此,综合各项生理生化指标的变化,“琉球红”杜鹃是较为耐寒的,温度在-3℃以上就可以维持正常的生理活性和生长,甚至在短时间的-6℃也能对低温胁迫产生一定的抗性,但是在极低的温度下,会导致其新陈代谢严重失衡,细胞受损,不能完成正常生理周期和生长。试验表明,“琉球红”杜鹃能耐受的较低温度为-3℃,其在南方大多数城市的冬季能够正常生长和开花,可以作为良好的绿化候选品种。

参考文献

- [1] 卢作玉,张严君.比利时杜鹃花智能温室栽培技术[J].现代农业科技,2007(22):33.
- [2] 吴福建,李凤兰,黄凤兰,等.杜鹃花研究进展[J].东北农业大学学报,2008,39(1):139-144.
- [3] 余丽玲,何天友,陈凌艳,等.人工低温胁迫下西洋杜鹃生理生化指标的变化[J].农学报,2014,4(1):48-53.
- [4] 陶巧静,付涛,项锡娜,等.模拟酸雨对西洋杜鹃生理生态特性的影响[J].生态学报,2014,34(8):2020-2027.
- [5] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].广州:华南理工大学出版社,2002:31-32,117-120.

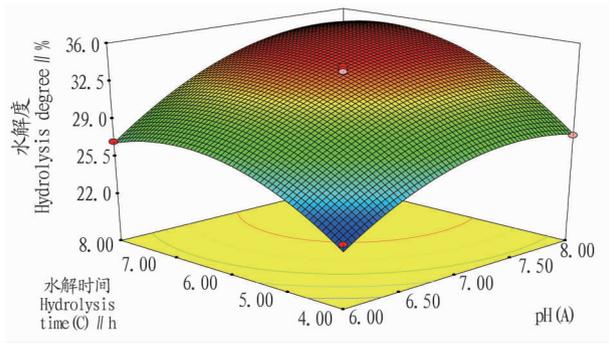


图10 pH与水解时间交互作用影响的响应面

Fig. 10 Response surface map of interaction between pH and hydrolysis time

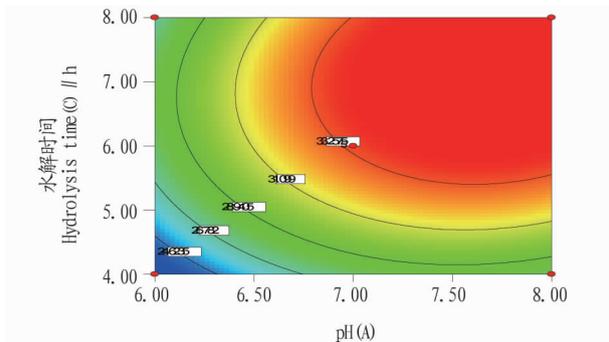


图11 pH与水解时间交互作用影响的等高线

Fig. 11 Contour map of the interaction between pH and hydrolysis time

79.41%。证明了响应面分析法对于酶解工艺的优化结果准确可靠,有较高实用价值。

3 结论

猪血经过高速离心分离,将血浆和血细胞分离,过滤浓缩、喷雾干燥,得到血浆蛋白粉。在pH、底物浓度、水解温度、酶解浓度、水解温度对蛋白水解的单因素影响试验中得出pH、水解时间和水解温度这3个因素的变化对蛋白水解度具有很明显的影响,加酶量和底物浓度这2个因素对于蛋白水解度的影响不大。通过响应面优化试验得出:各因素对血浆蛋白粉水解作用影响的大小顺序为pH > 水解时间 > 温度。该试验结果表明,猪血浆蛋白制备蛋白粉的最佳工艺条件为pH 7.7,温度46.3℃,水解时间7.4h;在此工艺条件下猪血清蛋白有很好的酶解效果。

参考文献

- [1] 赵艳,张凤枰,刘耀敏,等. 高效液相色谱法测定血浆蛋白粉中免疫球蛋白IgG[J]. 饲料研究,2010(8):47-48.
- [2] ZHOU Z T, LIU X M. The differences between spray-dried blood cells and dried whole blood powder [J]. The development and utilization of resources, 2006(10):39-40.
- [3] 刘中勇,马孝斌,高东微,等. 猪血浆蛋白粉中IgG含量的酶联免疫检测方法研究[J]. 饲料工业,2010,31(15):42-44.
- [4] 姚磊,赵海田,王静. 食品营养强化剂甘氨酸亚铁螯合物的合成工艺[J]. 食品与发酵工业,2004,30(9):69-71.
- [5] 张晓鸣,杜宣利. 甘氨酸亚铁络合物合成工艺的研究[J]. 饲料工业,1995,16(10):9-11.
- [6] 汪芳安,黄泽元,王海滨,等. 蛋氨酸亚铁螯合物的合成及表征[J]. 湖北化工,2001(4):17-19.
- [7] 秦卫东,吕兆启,涂宝军. 复合氨基酸亚铁的制备研究[J]. 中国食品添加剂,2003(6):42-45.
- [8] 刘萍,陈黎斌,杨严俊. 酶解玉米蛋白制备降压肽的研究[J]. 食品工业科技,2006,27(5):117-122.
- [9] CLEMENTE A, VIOQUE J, SÁNCHEZ-VIOQUE R, et al. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates [J]. Food chemistry, 1999,67(3):269-274.
- [10] 薛照辉,吴谋成,尹经章. 复合酶水解菜籽清蛋白的研究[J]. 中国粮油学报,2004,19(3):57-61.
- [11] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [12] WU Y X, VON TIEDEMANN A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone[J]. Environmental pollution, 2002,116(1):37-47.
- [13] 孔祥生,易现峰. 植物生理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2008:160-162.
- [14] FILEK M, WALAS S, MROWIEC H, et al. Membrane permeability and micro-and macroelement accumulation in spring wheat cultivars during the short-term effect of salinity and PEG-induced water stress[J]. Acta physiologiae plantarum, 2012,34(3):985-995.
- [15] 方志红,董宽虎. NaCl胁迫对碱蒿可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响[J]. 中国农学通报,2010,26(16):147-149.
- [16] WANB W B, KIM Y H, LEE H S, et al. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses[J]. Plant physiology and biochemistry, 2009,47(7):570-577.
- [17] 张兆英,宋立立. 园林植物抗寒性鉴定指标的分析[J]. 黑龙江农业科学,2012(2):60-62.
- [18] 孙存华,孙存玉,张亚红,等. 低温对香樟膜脂过氧化和保护酶活性的影响[J]. 广东农业科学,2011,38(4):58-60,65.
- [19] 王萍,张成军,陈国祥,等. 低温对水稻剑叶膜脂过氧化和脂肪酸组分的影响[J]. 作物学报,2006,32(4):568-572.
- [20] 柯世省,杨敏文. 水分胁迫对云锦杜鹃抗氧化系统和脂类过氧化的影响[J]. 园艺学报,2007,34(5):1217-1222.
- [21] 谭健晖. 马尾松优良种源苗木对人工低温胁迫的生理生化反应[J]. 林业科学,2013,49(3):51-55.
- [22] 刘春英,陈大印,盖树鹏,等. 高、低温胁迫对牡丹叶PSII功能和生理特性的影响[J]. 应用生态学报,2012,23(1):133-139.
- [23] 李春燕,陈思思,徐雯,等. 苗期低温胁迫对扬麦16叶片抗氧化酶和渗透调节物质的影响[J]. 作物学报,2011,37(12):2293-2298.
- [24] 何丽斯,汪仁,孟祥静,等. 茉莉扦插苗对模拟低温的生理响应[J]. 西北植物学报,2010,30(12):2451-2458.

(上接第31页)