

低温胁迫对山茶物种 2 个抗寒性生理指标的影响

王永红, 李纪元, 田敏, 格日乐图

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: 山茶; 低温胁迫; 电解质外渗率; 丙二醛

中图分类号: S794.4 文献标识码: A

Influences of Low Temperature Stress on *Camellia* Species' Two Physiological Index Related to Resistance to Coldness

WANG Yong-hong, LI Ji-yuan, TIAN min, Geriletu

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: In this paper four species, *C. chekiangoleosa*, *C. grijsi*, *C. octopetala* and *C. semiserrata* with different cold hardiness were used to determine the electrolyte leakage and MDA content in their leaves after treated with different low temperatures, 1.5 °C, -6.5 °C, -16 °C, -22 °C. Results showed that the plasma membrane permeability became much obviously with the fall of temperature. When the temperature is -16 °C, the electrolyte leakage of *C. chekiangoleosa*, *C. grijsi*, *C. octopetala* increased sharply to 1.89, 1.33, and 1.64 times more than that of the -6.5 °C. The electrolyte leakage of *C. semiserrata* was the most at -6.5 °C, which was 87.1% more than that of the 1.5 °C. MDA content changed regularly with the fall of temperature, raised at first and then declined. When the temperature is -6.5 °C, MDA content of *C. semiserrata* was the most, which was 2.42 times of the control; And when the temperature is -16 °C, MDA content of *C. chekiangoleosa*, *C. grijsi*, *C. octopetala* were the highest and were 75%, 1.39 times and 1.02 times respectively more than that of the control.

Key words: *Camellia*; low temperature stress; electrolyte leakage; MDA

山茶花是我国著名的木本花卉,在园林上主要用作地栽或者盆栽供观赏,少数品种也可用作盆景或者切花。花可入药,种子可以榨油食用,木材可供雕刻之用,总之山茶全身是宝。

但由于绝大多数山茶品种起源于抗寒冻较弱的红山茶(*Camellia japonica* Linn.)和云南山茶(*C. reticulata* Lindl.)^[1],长期以来不能在广大华北地区裸地栽培,只能局限于长江以南地区栽培,严重制约了山茶市场的培植和大规模产业化。已有资料发现山茶耐寒性与山茶叶片的生理和形态有关^[2],但有关

这方面的报道较少。

目前评价植物抗寒性大多数依然采用传统的褐变观测法、相对电导率法和丙二醛含量的测定^[3]。研究证明,褐变是植物受冻害的直接反应^[4,5]。1990—1992年庄瑞林^[2]对9个山茶物种和10个茶花品种的花芽冻害褐变进行过观察,发现花器官的抗寒能力强弱次序为:柱头>雄蕊>子房和花瓣,且山茶叶内部组织结构与抗寒力有一定的关系。膜系统是植物受低温伤害和抵抗低温伤害的关键结构,植物细胞电解质渗

收稿日期: 2005-01-13

基金项目: 国家“863”计划子课题“茶花高效育种技术及耐寒芳香茶花新品种培育研究”(2001AA241202)

作者简介: 王永红(1979—),女,河北张家口人,中国林业科学研究院亚热带林业研究所研究生。

漏的多少常反应在低温下植物受伤害的严重程度,抗寒性弱的植物(或受害较重者),细胞膜透性增大程度较快,且不可逆转,不能恢复正常,以至造成伤害或死亡。这种变化大多出现在形态变化之前,因而质膜的透性变化可显示细胞膜结构和功能受损程度^[6~8]。用电导仪测定细胞外渗液电导率即相对电导率变化,是用来反映细胞膜伤害程度和大小的一个重要指标^[7,8],骆琴娅等^[9]采用此方法对8个山茶物种幼林离体叶片进行过低温胁迫测定膜伤害。在逆境条件下,机体大量产生自由基、羟自由基、过氧自由基和氮氧自由基。这些自由基攻击不饱和脂肪酸,形成脂质自由基,启动脂质过氧化,对生物膜产生极大的破坏,而过氧化脂质代谢产物就是丙二醛(MDA)因此丙二醛含量多就反应植物耐寒性弱,反之含量少就反应了植物耐寒性强。据此作者研究了低温胁迫对山茶叶片电解质外渗率和丙二醛含量的影响,探讨山茶耐寒的生理机制,为培育山茶耐寒新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材来自亚热带林业研究所山茶种质资源圃,树龄为10~15 a。选用抗寒性不同的4个山茶物种:浙江红山茶(*Camellia chekiangoleosa* Hu)、攸县油茶(*C. grijsii* Hance)、茶梨油茶(*C. octopetala* Hu)、南山茶(*C. semiserrata* Chi.)^[11]。于2004年2月中旬采样。

1.2 试验方法

1.2.1 低温处理 从正常发育的1年生枝条随机采取枝条顶部的叶片,每处理25片叶为1组,装在封口塑料袋中,带回室内。每25片叶又分为两小组:一组10片叶,放在低温冰箱内进行人工低温胁迫,4个处理温度为:1.5、-6.5、-16、-22℃,每温度下处理12 h,然后取出样品,在室温下静置3 h,待测相对电导率和丙二醛含量,对照为田间温度(10~15℃);另一组15片叶,处理温度为:-1、-4、-9℃,每温度下处理时间为:6、12、24 h,然后取出样品,在室温下静置3 h,待测叶片褐变情况。

1.2.2 相对电导率的测定^[7~11] 选取经过冷冻且薄厚均匀的叶片,包在湿纱布中用自来水轻轻冲洗,除去表面污垢,再用去离子水冲洗1~2次,用干净的纱布轻轻吸干叶片表面水分;避开大叶脉,用

直径为0.6 cm打孔器打取圆叶10片,放入小玻璃杯,准确加入20 mL超纯水,浸没样品(不要使叶片叠在一起),在20~30℃条件下震荡保温2~3 h,将各样品的组织外渗液分别倾入小玻璃杯中,用DDS-12A型电导仪测沸前电导率;再将样品置沸水中煮沸10~15 min,测定沸后电导率;以不加叶片的超纯水作空白测定,各处理样品测定减去空白测定值即为实际电导率。每个处理重复3次,取平均值。

$$\text{相对电导率} = \frac{\text{沸前实际电导率}}{\text{沸后实际电导率}} \times 100\%$$

1.2.3 丙二醛含量的测定^[12] 称取剪碎的上述冷冻的植物叶片1 g,加入质量浓度为100 g·L⁻¹的三氯乙酸(TCA)2 mL和少量石英砂,研磨至匀浆,再用8 mL三氯乙酸分3次洗涤研钵,将所有匀浆以4 000 r·min⁻¹离心10 min,上清液为样品提取液;吸取上清液2 mL(以2 mL的蒸馏水作为对照),加入2 mL质量浓度为6 g·L⁻¹的硫代巴比妥酸溶液,混匀后在沸水浴上反应15 min,迅速冷却后再离心。取上清液在600、532、450 nm波长下测消光值。根据植物组织的质量计算样品提取液中丙二醛含量。每处理做3个重复,取平均值。

$$MDA(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{6.45(D_{532} - D_{600}) - 0.56D_{450}}{W}$$

公式中:W表示材料质量(g),D₄₅₀、D₅₃₂、D₆₀₀分别代表450、532、600 nm波长下的消光值。

2 结果与分析

2.1 不同低温胁迫对4个山茶物种叶片颜色的影响

由表1可以看出,在-1℃下胁迫6 h和12 h,各山茶物种叶片均未出现褐变,当胁迫时间延长到24 h后,只有浙江红山茶和南山茶出现褐变斑点;随着温度的降低及低温胁迫时间的延长,山茶叶片褐变加重,其中南山茶出现深褐变所对应的温度比较高,在-4℃下胁迫24 h叶片出现大面积深色褐变,并且深褐色的叶片达总观测数的60%,而其它3个物种在-4℃胁迫24 h只出现极少数的浅色褐变,褐变叶片数达总观测数的20%;当温度降低到-9℃胁迫6 h后,南山茶所有叶片均变为深褐色,说明南山茶最不抗寒。浙江红山茶、攸县油茶及茶梨油茶在温度降低到-9℃胁迫24 h,褐变叶片分别占总数67%、53%、60%。综上可见4个山茶物种抗寒性强弱的顺序为攸县油茶>茶梨油茶>浙江红山茶>南山茶。

表1 低温胁迫下不同山茶物种叶片褐变数量和程度

物种	-1℃			-4℃			-9℃		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
浙江红山茶	0	0	1(点)	3(点)	4(点)	3(浅)	4(深)	6(深)	10(深)
攸县油茶	0	0	0	0	1(点)	3(浅)	5(深)	5(深)	8(深)
茶梨油茶	0	0	0	0	1(点)	3(浅)	5(深)	6(深)	9(深)
南山茶	0	0	8(点)	9(点)	6(浅)	9(深)	15(深)	15(深)	15(深)

注:数字后面的括号中,“点”表示出现点状浅褐色;“浅”表示出现大面积浅褐色;“深”表示出现大面积深褐色。每物种供试15片叶。

2.2 不同低温胁迫对相对电导率的影响

表2可见,随着温度降低,不同山茶物种电解质外渗率均出现不同程度的增加。浙江红山茶、攸县油茶、茶梨油茶在温度达-16℃时电解质外渗率均出现急剧增多的趋势,分别比-6.5℃时电解质外渗增加1.89、1.33、1.64倍,而南山茶则在温度到达-6.5℃时电解质外渗率就已经出现急剧增多的现象,比1.5℃时电解质外渗率增加87.1%,可见南山茶比其它3个物种较不耐寒;当温度下降到-22℃时,南山茶依然保持最高的电解质外渗率,达78%。与骆琴娅等^[9]分别在3℃和-8.5℃下测定南山茶膜伤害率为7.8%和82.6%相比,其临界温度有着一定程度的吻合。测定结果作方差分析,由表3可以看

出,山茶物种间和温度处理间电解质外渗率差异显著性分别达5%和1%,可见不同物种之间随着温度的降低耐寒性表现出很大的差别,物种间多重比较结果显示耐寒性之间的差异主要表现在南山茶与其它3个物种之间。

表2 低温处理下不同山茶物种相对电导率的变化

物种编号	物种名称	10~15℃	1.5℃	-6.5℃	-16℃	-22℃
A1	浙江红山茶	22.6	23.5	24.3	70.3	73.8
A2	攸县油茶	23.4	23.9	27.8	64.7	69.3
A3	茶梨油茶	21.8	23.5	25.9	68.5	69.3
A4	南山茶	32.3	34.9	65.3	74.6	78.0

表3 低温处理下不同山茶物种相对电导率方差分析及多重比较

变异来源	自由度	平方和	均方	F值	显著水平	物种编号	5%显著水平
物种间	3	0.08	0.03	5.50	*	A4	a
处理温度间	4	0.88	0.22	43.49	**	A1	b
误差	12	0.06	0.01			A2	b
总变异	19	1.02				A3	b

注:“*”表示差异显著($\alpha=0.05$),“**”表示差异极显著($\alpha=0.01$),下同。

因为山茶物种叶片电解质外渗率随温度的变化呈“S”型曲线,符合Logistic方程变化趋势,利用电解质外渗率拟合Logistic方程^[13],即 $y = k / (1 + e^{(a-bx)})$ 来确定半致死温度(LT_{50})见表4。结果表明浙江红山茶、攸县油茶、茶梨油茶、南山茶物种的半致死临界温度依次为-11.810、-12.516、-11.970、-1.935℃,从半致死温度所反应的山茶耐寒性强弱来看,耐寒顺序为攸县油茶>茶梨油茶>浙江红山茶>南山茶。其中浙江红山茶和茶梨油茶临界温度比较接近,相差只有0.16℃;从表1低温胁迫下叶片褐变数量和程度结果看,它们之间的区别也并不大。

表4 Logistic方程及山茶各物种半致死温度

物种名称	Logistic方程	$LT_{50}/℃$
浙江红山茶	$Y = 0.980 / (1 + e^{(1.438 - 0.105x)})$	-11.810
攸县油茶	$Y = 0.967 / (1 + e^{(1.245 - 0.105x)})$	-12.516
茶梨油茶	$Y = 0.899 / (1 + e^{(1.258 - 0.124x)})$	-11.970
南山茶	$Y = 0.774 / (1 + e^{(-0.231x - 0.154)})$	-1.935

注:表中Y表示相对电导率(%),X表示所对应的温度(℃)。

2.3 不同低温胁迫对山茶物种叶片中丙二醛(MDA)含量的影响

由表5可以看出,山茶叶片中丙二醛的含量随着温度的降低,较对照(10~15℃)均出现了不同程度的升高,其变化趋势都是先增加后降低,其中南山茶丙二醛含量达到最大所对应的温度比较高,为

-6.5℃,此时丙二醛浓度比对照增加了2.42倍,南山茶比其它3个物种耐寒性差。浙江红山茶、攸县油茶、茶梨油茶都是在温度降到-16℃时丙二醛含量达到最高,且浙江红山茶丙二醛含量增加的幅度最小,比对照增加75%,其次是攸县油茶,比对照增加1.39倍,再次是茶梨油茶,比对照增加1.02倍。可知抗寒性大小顺序为浙江红山茶>茶梨油茶>攸县油茶>南山茶;当温度降低到-22℃后,各物种丙二醛含量都有所下降。试验结果作方差分

析,多重比较采用新复极差法,见表6。

表5 不同低温处理下山茶各物种丙二醛质量浓度

物种编号	物种名称	nmol · g ⁻¹				
		10~15℃	1.5℃	-6.5℃	-16℃	-22℃
A1	浙江红山茶	7.13	7.87	10.46	12.47	7.27
A2	攸县油茶	4.43	5.54	8.31	10.58	6.13
A3	茶梨油茶	6.72	8.03	12.87	13.59	9.77
A4	南山茶	5.94	10.74	20.30	16.37	11.31

表6 不同低温胁迫下山茶各物种丙二醛含量方差分析及多重比较

变异来源	自由度	平方和	均方	F值	显著水平	物种编号	1%显著水平	5%显著水平
物种间	3	91.97	30.65	8.81	**	A4	A	a
处理温度间	4	162.24	40.56	11.66	**	A3	AB	b
误差	12	41.77	3.48			A1	B	bc
总变异	19	295.99				A2	B	c

通过方差分析,低温胁迫下山茶物种间和不同温度处理间丙二醛含量差异极显著,可见不同低温胁迫对山茶叶片中丙二醛含量变化是有较大影响的。多重比较的结果显示,南山茶叶片中丙二醛含量与浙江红山茶和攸县油茶叶片中丙二醛含量之间的差异显著性水平达1%,与茶梨油茶差异显著水平达5%,而浙江红山茶、攸县油茶和茶梨油茶在1%水平下没有差异性。

3 小结

电解质外渗率和低温胁迫叶片褐变所表现的规律比较吻合,可见用电解质外渗率反映山茶物种耐寒性强弱较为客观真实。丙二醛含量测定结果表明4个物种抗寒顺序与前2个指标测定结果有差别,但无论是形态指标还是生理指标都显示南山茶是4个物种中抗寒性最弱的。从4个物种原产地分布讲,南山茶主要产在广东广宁县,属于亚热带地区植物,而浙江红山茶原产区分布在浙江、湖南地区,攸县油茶分布在湖南攸县,茶梨油茶原产区分布在浙江南部,这3个物种都属于亚热带植物,多重比较的结果显示4个物种之间的耐寒性差别主要表现在南山茶与浙江红山茶、攸县油茶及茶梨油茶之间的差别,这显然与各物种在自然分布区所表现的抗寒性强弱基本相吻合,即高纬度地区的物种耐寒性要强于低纬度地区物种的耐寒性^[14]。

参考文献:

- [1] 闵天禄. 世界山茶属的研究[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2000: 259~291
- [2] 庄瑞林. 山茶的抗寒性问题[J]. 经济林研究, 1993, 11(2): 79~80
- [3] 董丽, 黄亦工, 麦娥, 等. 北京园林主要常绿植物抗冻性及测定方法[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(3): 70~73
- [4] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501~506
- [5] 蒋跃明, 陈绵达, 林植芳, 等. 香蕉低温酶促褐变[J]. 植物生理学报, 1991, 17(2): 157~163
- [6] Chen H J. Electrolyte leakage and Ethylene production induced by chilling injury of papayas[J]. Hortscience, 1985, 20(6): 1070~1072
- [7] 舍戈. 未结冰低温胁迫下小麦叶细胞质膜透性的变化进程及性质[J]. 植物生理学报, 1991, (3): 295~300
- [8] 王飞, 陈文登, 李嘉瑞. 应用 Logistic 方程确定杏枝条低温半致死温度的研究[J]. 河北农业技术师范学院, 1998, 12(4): 30~35
- [9] 骆琴娅, 漆龙霖, 杨昌智, 等. 低温对山茶属不同物种幼林期离体叶细胞的膜伤害[J]. 经济林研究, 1995, 13(1): 22~24
- [10] 王华, 王飞, 陈登文, 等. 低温胁迫对杏花 SOD 活性和膜脂过氧化的影响[J]. 果树科学, 2000, 17(3): 197~201
- [11] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 67~69
- [12] 吕成群, 黄宝灵. 低温胁迫对巨尾桉幼苗膜脂过氧化及保护酶的影响[J]. 广西植物, 2004, 24(1): 64~68
- [13] 梁莉, 谈锋. 四川大头茶低温半致死温度与对低温的适应性[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1997, 22(4): 463~465
- [14] 刘鸣远. 抗寒花卉引种途径刍议[J]. 北方园艺, 1994, (6): 53~54