中国农学通报 2009,25(11):123-127
Chinese Agricultural Science Bulletin

高温胁迫对蝴蝶兰幼苗叶片形态和生理特性的影响

杨华庚,陈慧娟
(海南大学农学院,海南儋州 571737)

摘 要:在(40±0.5)℃/(30±0.5) (昼/夜)的高温条件下进行连续6天的处理,观察了蝴蝶兰幼苗的形态变化,研究了蝴蝶兰幼苗叶片某些生理生化指标的变化。结果表明,随胁迫时间的延长,超氧阴离子自由基($O_2^{-}\cdot$)产生速率加快,丙二醛(MDA)含量增加,细胞膜脂过氧化作用明显加强;可溶性糖含量、脯氨酸含量逐渐增加;在高温处理2天内,可溶性蛋白质含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性迅速上升,但相对电导率的增加并不大,叶绿素含量的下降也较小,与对照处理的相比差异不显著,说明蝴蝶兰幼苗可通过增加可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸含量以及SOD、POD、CAT活性来提高其耐热性。之后随着胁迫时间的延长,可溶性蛋白含量、叶绿素含量以及SOD、POD、CAT活性显著下降,相对电导率急剧上升,蝴蝶兰幼苗受害明显加重。

关键词:蝴蝶兰;高温胁迫;渗透调节;细胞保护酶;膜脂过氧化;耐热性
中图分类号:S682.31 **文献标识码**:A

Effect of High Temperature Stress on Morphological and Physiological Characteristics in *Phalaenopsis* Seedlings

Yang Huageng, Chen Huijuan
(*College of Agronomy, Hainan University*, Danzhou Hainan 571737)

Abstract: *Phalaenopsis* seedlings were treated at (40±0.5) ℃/(30±0.5)℃(day/night temperature) for 6 day, the morphological characteristics and several related physiological indexes in *Phalaenopsis* seedlings were determined. The results showed that generation rate of the superoxide free radical($O_2^{-}\cdot$),contents of malondialdehyde (MDA), soluble sugar and free proline were gradually increased with the time of high temperature continuing; During the early 2 day of treatment, soluble protein content, superoxide dismutase (SOD), peroxidase(POD), catalase (CAT) activities increased dramatically ,but electrolytic leakage and chlorophyll content changed slightly, there were no significant difference in comparison with control. The results indicated that the heat tolerance of *Phalaenopsis* seedlings was improved by enhancing the contents of soluble protein, soluble sugar, free proline and activities of SOD, POD, CAT. And with stress time lasting, the contents of soluble protein, chlorophyll, the activities of SOD,POD and CAT decreased remarkably, electrolytic leakage ascended sharply. *Phalaenopsis* seedlings suffer injury significantly.

Key words: *Phalaenopsis*, high temperature stress, osmotic adjustment, antioxidative enzyme, membrane lipid peroxidation, heat tolerance

---

基金项目:海南省高等学校科学研究项目"蝴蝶兰不同品种耐热性的研究"(Hj2009-33);华南热带农业大学科技资金项目"高温胁迫下蝴蝶兰的生理特性研究"(Rnd0604);海南省作物栽培学与耕作学重点学科资助。
第一作者简介:杨华庚,男,1966年出生,硕士,讲师,主要从事热带作物栽培生理生态研究。通信地址:571737 海南儋州海南大学(儋州校区)农学院,Tel:0898-23301040,E-mail:hg-yang@163.com。
收稿日期:2009-01-05,**修回日期**:2009-04-20。

0 引言

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* SSP)是一类生长在热带及亚热带地区的附生兰,属多年生常绿草本植物。其最适宜生长温度是18~28 ℃[1],当温度处于28 ℃以上时,花芽分化受抑制[2];当温度超过32 ℃时植株进入半休眠状态,生长发育严重受阻[3]。可见,蝴蝶兰的生长发育对高温敏感。由于高温热害是蝴蝶兰生产上所面临的重要问题,因此,研究和探讨高温胁迫下蝴蝶兰体内的生理代谢变化,对蝴蝶兰抗热害栽培具有重要意义。目前,关于蝴蝶兰高温研究方面,主要集中在赤霉素、细胞分裂素与成花的关系[4-5]、细胞分裂素种类与水平的变化[6]方面,而对高温胁迫下蝴蝶兰的防御机制和伤害机理的研究较少。Ali MB等[7]研究了高温胁迫对蝴蝶兰叶片膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响,结果表明,高温胁迫下,蝴蝶兰植株体内细胞膜脂过氧化作用增强。与对照(25 ℃)处理相比,30 ℃处理能诱导蛋白质合成,并增强抗氧化酶系统,极大地保护细胞免受高温的伤害,然而在40 ℃处理下抗氧化酶系统受到削弱。笔者从活性氧代谢、膜脂过氧化、质膜透性、细胞保护酶、细胞渗透调节物质等方面进一步探讨高温胁迫下蝴蝶兰植株的适应机制和伤害机理,为蝴蝶兰抗热害栽培、抗热害育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

试验材料为无性系的黄色斑点蝴蝶兰盆苗,由海南博大兰花科技有限公司采用组培苗在控温控光的温室内培育而成。在幼苗的生长期间,进行正常的水肥管理和病虫害防治。当幼苗长有4~5片叶时,于2007年8月将盆栽幼苗购入,随即在海南儋州的华南热带农业大学内进行试验研究。

1.2 试验材料的处理

选取高度、长势、叶数一致,最近末抽心叶的幼苗植株先放置于HPG-320H人工气候箱在(25±0.5)℃/(20±0.5) ℃ (8:00~20:00/20:00~8:00)进行约5天的预处理。在处理期间,空气相对湿度为75%~80%,光照强度为110 μmol/(m^2·s),光照时间为12 h,定期适度浇水以保持基质湿润。预处理结束后,接着进行 (40±0.5)℃/(30±0.5)℃(8:00~18:00/18:00~8:00) 高温处理。除温度处理外,其他环境条件与预处理的相同。分别在处理0、2、4、6天取样测定生理指标。

1.3 生理指标测定

每处理结束后,剪取处理植株顶部最近成熟的叶片,洗净并用干净纱布拭干。采用3株幼苗混合取样,重复3次。

1.3.1 细胞保护酶活性测定 粗酶液的提取:称取0.5 g样品放入研钵内加入5 ml 50 mmol/L pH7.8磷酸缓冲液(内含2%PVP)在冰浴研磨,匀浆移入离心管内,置于4 ℃ 10000×g冷冻离心机离心20 min,上清液用于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢(CAT)活性、可溶性蛋白质含量测定。

酶活性测定:SOD活性测定参照高俊凤[8]的方法,以抑制NBT还原率达50%的酶量为一个酶单位(U)。POD活性、CAT活性测定参照陈建勋等[9]的方法。POD活性以每分钟OD_{470}增加0.01的酶量为1个酶活力单位(U);CAT活性以每分钟OD_{240}减少0.01的酶量为1个酶活力单位(U)。

1.3.2 其他生理指标测定 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$·)含量测定采用羟胺氧化法、可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝G-250染色法、脯氨酸含量的测定采用磺基水杨酸提取,酸性茚三酮法,参照高俊凤[8]的方法;可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法,参照李合生[10]的方法。叶绿素含量测定采用丙酮乙醇混合法,参照张宪政[11]的方法。丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法,参照张志良[12]的方法。细胞膜相对透性的测定采用电导仪法,参照高俊凤[8]的方法。

1.4 数据整理与统计分析

分别采用Excel软件、SAS统计软件进行数据整理和统计分析。

2 结果分析

2.1 高温处理对蝴蝶兰幼苗植株形态的影响

高温处理2天,蝴蝶兰幼苗的叶片正常,呈浓绿色,与对照并无差异;处理4天,植株叶片褪绿且先端发黄;处理6天,植株叶片黄化明显,但未有植株死亡。将各处理27株的植株,置于室温进行培育,继续观察植株的受害和恢复生长情况。处理2天的所有植株,生长正常;处理4天的所有植株,叶片变为暗绿色或个别叶片腐烂,但未见有植株死亡;处理6天的所有植株,叶片或黄化或褐变或叶片腐烂,植株死亡率达33.3%。

2.2 高温处理对蝴蝶兰幼苗叶片叶绿素含量的影响

叶绿素含量是直接反映光合作用能力强弱的重要指标。经高温处理2天,叶绿素含量仅有轻微下降,只比对照(0天)下降了4.87%。但在处理4天,叶绿素含量出现急剧下降,比2天处理的下降了29.53%。之后继续大幅下降,降幅仍高达24.30%。统计分析表明,处理2天叶绿素含量与对照处理的差异不显著,而处理4、6天的叶绿素含量与对照处理的相比达极显著差异(见表1)。

表1 高温处理对蝴蝶兰叶片叶绿素含量、O_2^-·产生速率、MDA含量、相对电导率的影响

处理时间	叶绿素含量 /(mg/g)	O_2^-·产生速率 /(nmol/g.min)	MDA含量 /(nmol/g)	相对电导率 /%
0d	0.534±0.030aA	21.53±0.96cB	6.31±0.56dC	9.09±0.67cC
2d	0.508±0.035aA	25.29±1.13bB	7.63±0.52cB	11.16±1.07cC
4d	0.358±0.025bB	33.46±1.28aA	8.34±0.23bA	23.73±1.36bB
6d	0.271±0.026cB	30.92±1.58aA	8.81±0.26aA	34.86±2.54aA

注:表中数据为3次重复的平均值。差异显著性用Duncan检验,不同大写字母和小写字母分别表示在0.01和0.05水平上差异显著。下同。

2.3 高温胁迫对蝴蝶兰幼苗叶片超氧阴离子(O_2^-·)产生速率的影响

由表1可看出,高温处理0~4天,蝴蝶兰幼苗叶片O_2^-·产生速率呈不断上升的趋势,虽在处理6天有所回落,但仍比对照高出43.61%。统计分析表明,处理2、4、6天的O_2^-·产生速率与对照处理的相比达到显著或极显著性的差异。

2.4 高温胁迫对蝴蝶兰幼苗叶片丙二醛(MDA)和相对质膜透性的影响

MDA是膜脂过氧化作用产物之一,其含量变化反映质膜损伤程度。由表1可看出,高温胁迫下,随胁迫时间的延长,MDA含量呈不断上升的趋势。说明高温胁迫加剧了膜脂过氧化作用,使细胞结构遭受严重破坏。统计分析表明,处理2、4、6天的MDA含量与对照处理的相比达到极显著性的差异。

相对质膜透性直接反映植物质膜系统受伤的程度。由表1可看出,高温处理2天,相对电导率小幅增加,比对照处理的增加了22.77%。然而在处理4天,相对电导率却急剧上升,比处理2天的约高出1.13倍。之后,相对电导率仍快速上升。相对电导率的急剧增高,表明质膜系统受到了严重的破坏。统计分析表明,处理2天相对电导率与对照处理的差异不显著,而处理4、6天的相对电导率与对照处理的相比达极显著差异。

2.5 高温胁迫对蝴蝶兰幼苗叶片可溶性蛋白质含量、可溶性糖含量和脯氨酸含量的影响

由表2可看出,高温处理2天,蝴蝶兰幼苗叶片的可溶性蛋白质含量大量增加,比对照处理的高出20.03%,但处理4天,可溶性蛋白质含量却明显地减少,比处理2天的下降了11.87%,之后可溶性蛋白缓慢下降,处理6天的可溶性蛋白质含量已接近对照处理的水平。统计分析表明,处理2天的可溶性蛋白质含量与对照处理的相比,达到极显著性差异,而处理4、6天的可溶性蛋白质含量与对照相比差异不显著。

高温处理0~6天,蝴蝶兰幼苗叶片的可溶性糖含量和脯氨酸含量呈不断增加的趋势。统计分析表明,高温处理2、4、6天的可溶性糖含量和脯氨酸含量与对照处理的相比,达到显著或极显著的差异(表2)。

表2 高温处理对蝴蝶兰叶片可溶性蛋白含量、可溶性糖含量、脯氨酸含量的影响

处理时间	可溶性蛋白含量 /(mg/g)	可溶性糖含量 /(mg/g)	脯氨酸含量 /(mg/g)
0d	22.47±0.98bB	25.27±1.06dC	0.118±0.003dD
2d	26.97±0.83aA	30.76±1.97cBC	0.293±0.020cC
4d	23.77±0.30bAB	35.83±2.15bB	0.658±0.036bB
6d	23.16±1.53bB	44.36±1.22aA	1.12±0.061aA

2.6 高温胁迫对蝴蝶兰幼苗叶片SOD、POD、CAT活性的影响

SOD、POD、CAT是植物体内清除活性氧的重要细胞保护酶类,其大小可以反映植物对逆境胁迫的适应能力。由表3可看出,高温处理2天,蝴蝶兰幼苗叶片的SOD活性迅速增加,比对照处理的高出24.07%,而处理4天,SOD活性却急剧下降,比处理2天的下降了27.19%,并已低于对照处理的水平。之后SOD活性缓慢下降。统计分析表明,处理2天及6天的SOD活性分别与对照处理的相比达到极显著及显著性的差异,而处理4天的SOD活性与对照处理的相比差异不显著。POD、CAT活性变化趋势与SOD活性相一致,即高温处理2天,POD、CAT活性迅速增加并达到峰值,处理4天,POD、CAT活性急剧下降并远低于对照处理的水平。统计分析表明,处理2、4、6天的POD、CAT活性与对照处理的相比均存在显著或极显著的差异。高温胁迫下SOD、POD、CAT活性的提高,增强了蝴蝶兰幼苗清除活性氧的能力,大大地降低细胞膜脂过氧化程度,对提高蝴蝶兰幼苗的耐热能力起到了重要作用。

表3 高温处理对蝴蝶兰叶片SOD、POD、CAT活性的影响

处理时间	SOD活性 /(U/g)	POD活性 /(U/g)	CAT活性 /(U/g)
0d	171.57±6.14bB	66.34±6.15bB	112.45±9.00bB
2d	212.86±11.79aA	134.17±6.67aA	150±6.44aA
4d	154.99±10.01bcB	52.44±4.52cBC	78.82±1.95cC
6d	141.42±7.88cB	38.17±4.30dC	60.19±4.34dC

3 讨论

许多研究表明，植物在遭受逆境胁迫过程中，由于自由基的产生与清除的动态平衡关系被破坏，致使超氧阴离子自由基O_2^-及过氧化氢H_2O_2、羟自由基·OH等活性氧的累积，引发并加重膜脂过氧化作用，造成MDA含量大量增加，使细胞膜系统受到破坏。试验结果表明，在高温胁迫期间，蝴蝶兰幼苗叶片超氧阴离子(O_2^-)产生速率、MDA含量、相对电导率均增加。相关分析表明，超氧阴离子(O_2^-)产生速率与MDA含量呈极显著的正相关，其相关系数为r=0.81995(P < 0.01)；MDA含量与相对电导率呈极显著的正相关，其相关系数为r=0.83752(P < 0.01)。说明随着O_2^-产生速率的增加，膜脂过氧化作用加剧，造成MDA大量积累，积累的MDA与膜蛋白结合引起蛋白质分子内和分子间交联，蛋白质分子发生聚合，引起膜结构和功能的破坏，使质膜透性增大，细胞内溶物大量外渗，从而影响蝴蝶兰叶片的生理代谢功能，使植株受害严重。由此推测，高温胁迫下O_2^-·的大量积累是蝴蝶兰高温伤害的重要原因之一。

植物在遭受高温胁迫后，活性氧会大量产生，从而诱导有关保护酶类表达量和活性的提高，相互间协同作用，共同清除过多的活性氧，以减轻高温对其的伤害作用。SOD、POD、CAT是细胞内清除活性氧的保护酶系统，SOD活性受O_2^-·的诱导，它可歧化O_2^-·为H_2O_2和O_2，生成H_2O_2又诱导POD和CAT活性提高，并将H_2O_2清除，以避免植株体内积累的H_2O_2形成氧化能力极强的·OH，从而造成对细胞的毒害作用。试验结果表明，高温胁迫初期，蝴蝶兰幼苗叶片超氧阴离子(O_2^-·)产生速率和MDA含量在明显增加的同时，细胞保护酶SOD、POD、CAT活性也相应增强，提高了清除活性氧的能力，使活性氧的毒害作用并不强烈，细胞质膜透性与对照相比差异不显著，说明细胞保护酶在高温胁迫中起到了积极保护作用。之后随着胁迫时间的延长，超氧阴离子(O_2^-)的产生速率依然在继续增加，而细胞保护酶活性却出现急剧下降，并明显低于对照处理的水平，致使清除活性氧的能力显著降低，造成O_2^-的大量积累，使兰花幼苗植株遭受严重的损害。

Ali MB等[7]研究表明，30℃处理2天，蝴蝶兰植株的蛋白质合成加强，抗氧化酶活性增强，但在40℃处理下，除POD活性明显增强外，SOD、CAT活性显著减弱，蛋白质含量明显下降。在试验中，高温处理2天内，蝴蝶兰幼苗的可溶性蛋白质含量不断增加，SOD、POD、CAT活性迅速增强，但在随后则出现显著下降。说明在适宜的热胁迫下，细胞保护酶系统能被显著诱导并增强，保护植株免受高温胁迫的伤害，而当胁迫强度超出蝴蝶兰植株的耐受能力时，细胞保护酶系统则明显受抑甚至丧失。

高温胁迫诱发细胞脱水，是植物高温伤害的重要原因之一，因此提高高温胁迫下植物内渗透调节物质含量水平对植物维持体内水分平衡具有重要的意义。可溶性蛋白是细胞内的重要渗透调节物质，具有渗透调节和防止细胞质脱水的作用。大量研究表明，植物体在高温、盐渍、干旱等环境胁迫下会诱导合成热激蛋白，并能提高植物的抗逆性[13]。此试验中，高温胁迫初期蝴蝶兰幼苗叶片可溶性蛋白含量增加，可能与热激蛋白的急剧合成或诱导并增加耐热性酶的含量和活性有关。可溶性蛋白质含量的增加，能提高蝴蝶兰幼苗对高温胁迫的适应能力。随着胁迫时间的延长，因蛋白质合成受阻，可溶性蛋白降解等原因，致使蝴蝶兰幼苗叶片的可溶性蛋白含量不断下降，从而降低了蝴蝶兰幼苗的耐热性。可溶性糖和脯氨酸是植物细胞内的重要保护物质，具有渗透调节和保护细胞膜结构的稳定作用[14]。试验结果表明，高温胁迫初期，可溶性糖含量、脯氨酸含量比胁迫前均有显著的增加，而此时，细胞质膜透性并未有显著的变化，说明此时蝴蝴兰幼苗植株体内积累的可溶性糖和脯氨酸对其抗热害起到积极的作用。随着胁迫时间的延长，可溶糖含量、脯氨酸含量仍在显著持续增加，但细胞质膜透性却急剧增大，表明蝴蝶兰幼苗受害加重。说明高温胁迫超出蝴蝶兰幼苗的忍耐能力后，可溶性糖、脯氨酸的大量积累可能是蝴蝶兰对高温伤害的被动反应。

高温胁迫引起叶绿素含量下降已被众多研究所证实。叶绿素下降可能原因是：一、高温胁迫降低了叶绿素的合成速率[15]。二、高温胁迫下，光合作用的关键酶

Rubisco活化酶失活,RuBP羧化酶活性降低以及NADPH再生$NADP^+$的不足,导致电子传递链失衡,多余的电子通过Mehler反应将O_2还原为O_2^-,积累的O_2^-可通过Fenton反应及Haber-weiss反应产生攻击力更强的·OH,进而直接启动膜脂过氧化,引起叶绿体结构与功能的破坏,引发叶绿素的分解破坏[16-18]。试验结果表明,高温胁迫初期,由于细胞保护酶活性处于较高的水平,使活性氧对细胞的损害较轻,叶绿素含量呈缓慢下降。其下降原因主要是由高温胁迫降低叶绿素的合成速率所致。随着胁迫时间的延长,细胞保护酶活性出现急剧下降,引起活性氧的大量积累,从而加速了叶绿素的分解破坏,导致叶绿素含量迅速下降。高温胁迫下引起叶绿素含量的大幅下降,会极大地降低了蝴蝶兰幼苗的光合能力,并加重高温对其的伤害程度。

综上所述,在适度的高温胁迫下,蝴蝶兰幼苗植株能启动应急的防御机制,主要是通过增加细胞渗透调节物质含量,提高细胞保护酶含量和活性来增强其对高温胁迫的适应能力。当高温胁迫强度超过蝴蝶兰幼苗的耐受能力后,其受到高温的伤害会日趋严重。

参考文献

[1] 黄胜琴,李永涛,吕翠婷,等.蝴蝶兰花芽诱导过程中碳水化合物在叶与腋芽中的分配变化.园艺学报,2007,34(6):1515-1519.

[2] Blanchard M G, Runkle E S. Temperature during the day, but not during the night, controls flowering of *Phalaenopsis* orchids. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(15): 4043-4049.

[3] 刘清涌,彭长荣.洋兰种养与鉴赏.辽宁:辽宁科学技术出版社,2006: 14-18.

[4] Su WR,Chen WS, Koshioka M,et al. Changes in gibberellin（GA3） levels in the flowering shoot of *Phalaenopsis* hybrida under high temperature conditions when flower development is blocked. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39(1): 45-50.

[5] Chen WenShaw,Chang HsuehWen,Chen WenHuei, et al. Gibberellic acid and cytokinin affect *Phalaenopsis* flower morphology at high temperature. HortScience, 1997, 32(6): 1069-1073.

[6] Chou ChinChih, Chen WenShaw, Huang KuangLiang, et al. Changes in cytokinin levels of *Phalaenopsis* leaves at high temperature. Plant Physiology and Biochemistry, 2000, 38(4): 309-314.

[7] Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. Effects of temperature on oxidative stress defense systems,lipid peroxidation and lipoxygenase activity in phalaenopsis. Plant physiology and Biochemistry, 2005, 43(3): 213-223.

[8] 高俊风.植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社,2006: 142-144;208-209; 211-213;221-222;228-231.

[9] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导.2版.广东:华南理工大学出版社,2006:72-73.

[10] 李合生.植物生理生化实验原理和技术.北京:高等教育出版社, 2000:195-197.

[11] 张宪政.作物生理研究法.北京:中国农业出版社,1992:148-149.

[12] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导.3版.北京:高等教育出版社, 2003:274-276.

[13] 许声涛,孙文香,田进平,等.植物热激蛋白HSP100/ClpB及其在提高植物抗热性和抗寒性中的应用.植物生理学通讯,2008,44(4): 804-810.

[14] 张桂莲,陈立云,张顺堂,等.抽穗开花期高温对水稻剑叶理化特性的影响.中国农业科学,2007,40(7):1345-1352.

[15] Tewan A K, Tripathy B C. Temperature-stress-induced impaired of chlorophyll biosynthetic reaction in cucumber and wheat. Plant Physiol, 1998, 117:851-858.

[16] Crafts-Brander S J, Salvucci M E. Rubisco Constrains the Photosynthetic Potential of Leaves at High Temperature and CO2. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:13430-13435.

[17] 姜春明,尹燕枰,刘霞,等.不同耐热性小麦品种旗叶膜脂过氧化和保护酶活性对花后高温胁迫的响应.作物学报,2007,33(1): 143-148.

[18] 伍泽堂.超氧自由基与叶片衰老时叶绿素破坏的关系.植物生理学通讯,1991,27(4):277-279.