

互叶白千层对冷害的生理响应

莫昭展¹, 施福军², 梁海清¹ (1. 玉林师范学院, 广西玉林 537000; 2. 广西高峰林场, 广西南宁 530001)

摘要 [目的] 研究互叶白千层对冷害的抗性机理。[方法] 以互叶白千层为试材, 取中部叶片, 测定冷害前后互叶白千层的电导率、过氧化物酶和硝酸还原酶活性以及丙二醛含量。[结果] 互叶白千层具有较强的抵抗低温的能力。低温处理后, 不同月份互叶白千层的电导率表现出明显的变化。12月份和4月份的冷害对互叶白千层的伤害最大, 3月份最小, 1月份和2月份相差不大。互叶白千层的POD活性呈现逐渐降低的趋势, 12月份最高, 3月份最低。3月份丙二醛含量最高, 12、4月份较高, 1月份最低。12、1月份互叶白千层的NR活性最高, 3月份最低, 4月份有所回升, 但幅度不大。[结论] 互叶白千层具有较强的抵御长时间低温冷害的能力。

关键词 互叶白千层; 冷害; 生理响应

中图分类号 S718.43 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14399-02

Physiological Response of *Melaleuca leucadendron* to Cold Damage

MO Zhao-zhan et al (Yulin Normal College, Yulin, Guangxi 537000)

Abstract [Objective] The study was to research the resistance mechanism of *Melaleuca leucadendron* to cold damage. [Method] With *M. leucadendron* as the tested material, its middle leaves were taken to detect the conductivity, the activities of POD and NR and content of MDA of *M. leucadendron* pre and post of cold damage. [Result] *M. leucadendron* had a strong resistance to low temperature. After treatment at low temperature, the conductivity of *M. leucadendron* in different months showed an obvious change. The damage of cold damage in December and April on *M. leucadendron* was the biggest and that in March was the least, and that in January and February had little difference. The POD activity of *M. leucadendron* showed a trend of gradually decreasing, and the POD activity in December was the highest and that in March was the lowest. The MDA content in *M. leucadendron* was the highest in March, and that was higher in December and April and that was the lowest in January. The NR activity of *M. leucadendron* was the highest in December and January, and that was the lowest in March and had a little upturn in April. [Conclusion] *M. leucadendron* had stronger resistance to low temperature damage with long time.

Key words *Melaleuca leucadendron*; Cold damage; Physiological response

互叶白千层(*Melaleuca leucadendron*)原产于澳大利亚新南威尔士沿海一带, 是桃金娘科白千层属的灌木树种^[1]。一般种植1年即可采收, 萌芽力强, 可一次种植, 多次收获, 是一种短期栽种培育就可以投入利用的经济林木^[2]。

近年来, 我国在互叶白千层的引种栽培、茶树油的提取与利用、化学成分分析等方面的研究较多^[1-5], 但对于互叶白千层的生理指标的测定方面的研究较少。2008年1月中旬到2月初, 南方大部分地区遭受了百年不遇的低温及冰冻灾害, 笔者对冷害前后互叶白千层的电导率、过氧化物酶活性、丙二醛含量、硝酸还原酶活性进行分析, 对互叶白千层的抗性机理的研究及区域推广具有一定的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 从位于广西玉林市的互叶白千层的种植基地每次随机选择50株3年生植株, 剪取中部的枝叶作为试验材料, 每个指标测定5个重复。

1.2 试验方 法

1.2.1 叶片伤害度的测定^[6]。先将新鲜叶片用去离子水反复冲洗擦干净, 将叶片分为2组, 每组5份, 每份1g。将叶片置于小烧杯中, 加入20ml去离子水, 震荡, 加塞, 并做好标记。第1组置于-20℃左右的温度下处理20min, 第2组置于室温下保湿作对照。

经过一定时间后, 用电导仪测定溶液的电导率值(S_1), 然后置于沸水中10min, 冷却后测定总溶液总电导率(S_2)。计算公式如下:

$$\text{相对电导度公式: } L_t = S_1 / S_2$$

$$\text{伤害度外渗公式: 伤害度} = [(L_t - L_{ck}) / (1 - L_{ck})] \times$$

100%

式中, L_t 为处理叶片的相对电导度, L_{ck} 为对照叶片的相对电导度。

1.2.2 叶片过氧化物酶(POD)活性的测定(比色法)^[6]。

1.2.2.1 粗酶液的提取。称取1g新鲜成熟互叶白千层叶片, 剪碎于研钵中, 加20mmol/L KH_2PO_4 5ml, 于研钵中研磨成匀浆, 以4000r/min离心15min, 收集上清液保存在冷处, 所得残渣再用5ml KH_2PO_4 提取1次, 合并2次上清液, 并保存在冷处备用。

1.2.2.2 酶活性的测定。取光径1cm比色杯2只, 于1只中加入3ml反应混合液及1ml KH_2PO_4 , 作为校零对照, 另1只中加入3ml反应混合液及上述酶液1ml(如酶活性过高可稀释), 立即开启秒表记录时间, 于分光光度计上测量吸光度值, 每隔1min读数1次, 读数于波长470nm下进行。以每分钟内 A_{470} 变化0.01为1个过氧化物酶活性单位(U), 计算公式如下:

$$\text{POD} [\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})] = (A_{470} \times V_t) / (0.01 W_f \times V_s \times t)$$

式中, V_t 为提取酶液总体积(ml); W_f 为叶子鲜重(g); V_s 为测定时取用酶液体积(ml); t 为反应时间(min)。

1.2.3 叶片丙二醛(MDA)含量测定^[7]。称取叶片切段1g, 放入研钵中, 加入5ml 10%三氯乙酸(提前冷冻)和少许石英砂, 研磨成匀浆, 将匀浆转移到试管中, 再用5ml 10%三氯乙酸冲洗研钵, 合并提取液, 4000r/min离心10min, 取上清液冷藏备用。

吸取2ml上清液(对照用2ml蒸馏水), 加入2ml 0.6%硫代巴比妥酸溶液, 混合均匀, 置于沸水浴中反应15min, 迅速冷却后离心。取上清液测定450、532、600nm波长的消光度(OD值)。计算公式如下:

$$C = 6.54(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$$

$$\text{MDA} (\mu\text{mol}/\text{g}) = C \times N / W$$

基金项目 广西自然科学基金项目(桂科自0832099); 广西教育厅项目(GJKY2008041); 玉林师范学院青年基金项目(200703)。

作者简介 莫昭展(1974-), 男, 广西玉林人, 博士, 副教授, 从事植物种质资源利用的教学与研究。

收稿日期 2008-09-22

式中, C 为丙二醛的浓度; N 为提取液总体积(ml); W 为样品鲜重(g)。

1.2.4 叶片硝酸还原酶(NR) 活性的测定^[7]。将新鲜取回的互叶白千层枝条置于 50 ml 硝酸钾溶液中, 并于光照培养室进行光诱导 12 ~ 24 h。剪取光诱导后的互叶白千层成熟叶子, 用蒸馏水洗涤 3 次, 吸干水分, 用电子天平称取 6 份等重的叶子(1.0 g), 分别置于含有下列溶液的 50 ml 三角烧瓶中。对照三角瓶中加入 30% 的三氯乙酸溶液 1 ml, 然后其他 5 个三角瓶中加入 0.1 ml/L KNO_3 溶液 9 ml, 分别将上述的反应液及叶子倒入真空干燥器抽气, 反复多次, 使叶片沉入溶液后, 将三角烧瓶置于 30 °C 温箱中, 遮光保温 30 min 后, 向试验组瓶加入 30% 的三氯乙酸溶液 1 ml, 终止酶反应。将 6 个三角瓶摇匀静置 2 min 后, 分别吸取反应溶液 2 ml 于试管中, 加入 0.02% 萘基乙烯胺试剂 1 ml 及 1% 磺胺试剂 1 ml, 混合摇匀, 静置 15 min, 于 4 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液于分光光度计上测定其在 520 nm 处 OD 值, 从标准曲线计算出 NO_2^- 含量(μg)。NR 活性按以下公式计算:

$$NR[\mu g / (g \cdot h)] = X \times V_1 / (V_2 \times W \times t)$$

式中, X 为反应液中酶催化产生的 NO_2^- 含量(μg); V_1 为提取酶时加入的缓冲液的体积(ml); V_2 为酶反应时加入的粗酶液的体积(ml); W 为样品质量(g); t 为反应时间(h)。

2 结果与分析

2.1 不同月份叶片伤害度差异 方差分析表明, 各月份之间叶片伤害度达到极显著差异水平($F = 11.5414$, $P = 0.00005$)。如图 1 所示, 经过低温处理后不同月份互叶白千层电导率表现出明显的差异, 但也呈现出一定的规律。12 月份和 4 月份的伤害度最大, 3 月份的最小, 1 月份和 2 月份相差不大。研究结果表明, 12 月份时气温开始降低, 互叶白千层对外界温度的变化较敏感, 伤害度最高; 1 月份时互叶白千层已经表现出较强的抵抗能力, 故伤害度较低; 2 月份伤害度有小幅上升, 但变化不大, 说明互叶白千层具有抵御较长时间冷害的能力; 3 月份时伤害度最低, 可能与生长停滞有关; 4 月份时温度回升较快, 植物体进入生长期, 此时互叶白千层的抵抗低温冷害的能力较弱, 伤害度仅次于 12 月。从整体的伤害度数值来看, 5 个月的伤害度均小于 1, 说明互叶白千层具有较强的抵抗低温的能力。

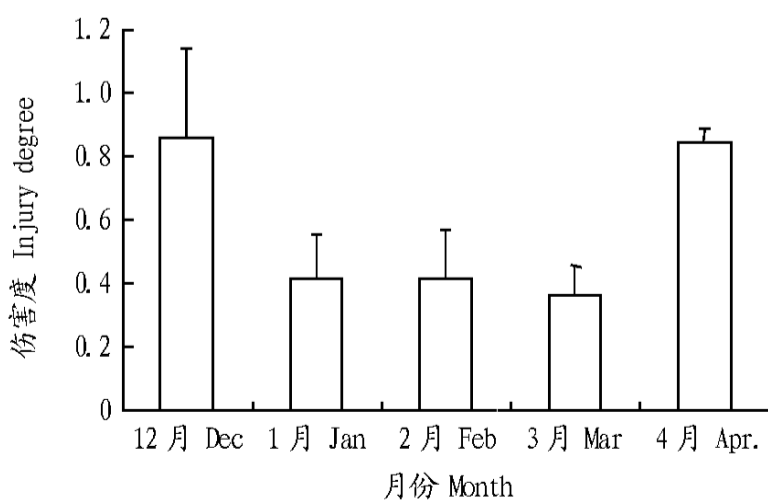


图1 不同月份伤害度的差异

Fig.1 The difference of injury degree among different months

2.2 不同月份叶片过氧化物酶活性差异 方差分析表明, 各月份之间 POD 活性达到极显著差异水平($F = 33.0496$, $P = 0.00001$)。如图 2 所示, 互叶白千层 POD 活性 12 月份最

高, 具有较强的清除植物体内过氧化物的能力; 3 月份最低, 呈现逐渐降低的趋势, 这表明互叶白千层 POD 活性随温度的降低而不断减弱; 4 月份有所上升, 但幅度不大; 酶活性最低点出现在 3 月份而非 2 月份, 分析原因可能是受 2 月份长时间的冷害影响, 3 月份时互叶白千层各项生理机能尚未完全恢复, 因而清除植物体内过氧化物的能力较弱。3 月份实地采样时发现, 互叶白千层嫩叶受害较严重, 表现为嫩梢前期枯黄, 后期枯死, 成熟叶片受害较轻, 叶片出现褐色的斑点; 4 月份后生长逐渐恢复。

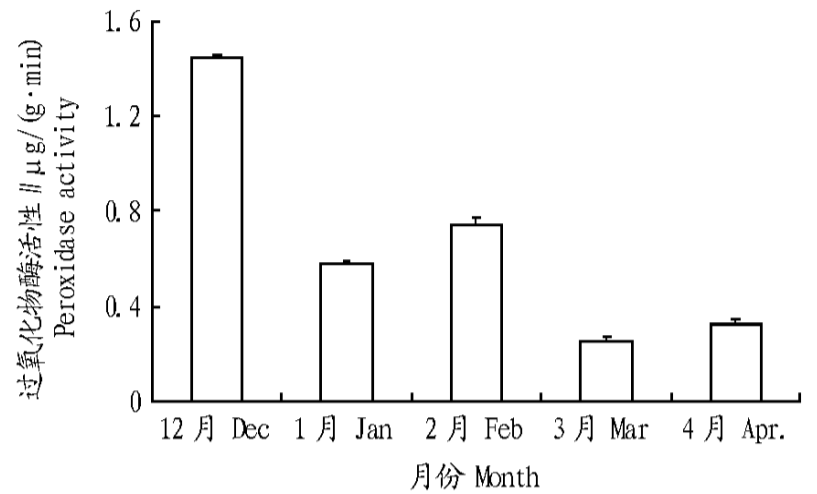


图2 不同月份过氧化物酶活性差异

Fig.2 The difference of peroxidase activity among different months

2.3 不同月份叶片丙二醛含量差异 方差分析表明, 各月份之间 MDA 含量达到极显著差异水平($F = 124.85$, $P = 0.00001$)。如图 3 所示, 3 月份丙二醛含量最高, 12、4 月份也较高, 1 月份最低。分析原因可能是 12 月份时因经历了较长一段时间的干旱, 导致植物体细胞膜氧化程度增强, MDA 含量较高; 1 月份后有少量降雨, 植物体细胞膜氧化程度得到很大程度的缓解, 此时的互叶白千层体内 MDA 含量较低; 受到 2 月份长时间冷害的影响, 植物体细胞膜氧化程度有所增强, 但增幅不大, 说明互叶白千层对低温不敏感, 具有一定抵御冷害的能力; 危害在 3 月份时表现较为突出, 具有一定的延迟性; 4 月份后冷害危害下降, 植物体细胞膜氧化程度降低。

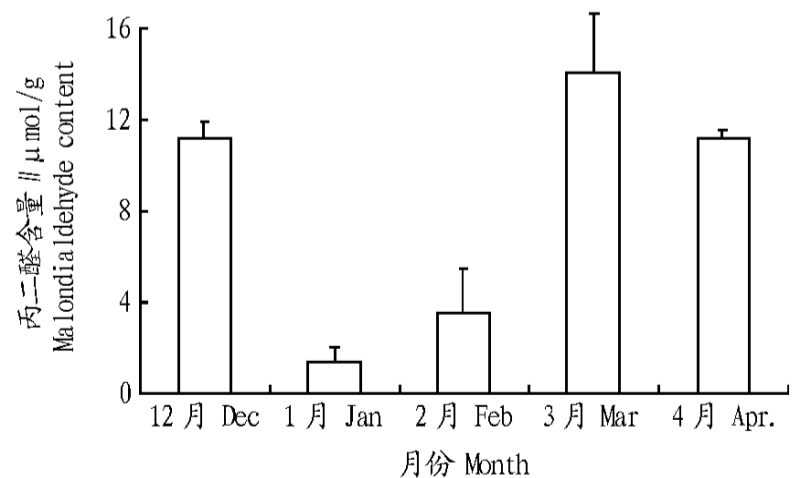


图3 不同月份丙二醛含量差异

Fig.3 The difference of malondialdehyde content among different months

2.4 不同月份叶片硝酸还原酶活性差异 方差分析表明, 各月份之间 NR 活性达到极显著差异水平($F = 185.6868$, $P = 0.0000001$)。如图 4 所示, 12、1 月份互叶白千层 NR 活性最高, 3 月份最低, 4 月份有所回升, 但幅度不大。12、1 月份时虽然已经开始进入冬季, 但是互叶白千层仍保持较高的 NR 活性, 表明此时的植物体仍具有一定的生长能力; 受到 2

片扩展和增加全株叶面积的同时,中下部烟叶在田间的通风透光能力与常规措施下有所不同。因此,应根据制剂的效果适当调整栽培中的种植密度,完善该项技术。同时,以往研究中关于处理的喷施方式和施用时间有所不同^[5,13-14],该试验中仅于打顶当天1次喷施,生产中使用方便,操作较强。

参考文献

- [1] TSOT C,JEFFERY R N.Studies ontobacco alkoids II The formation of nicotine and nornicotine in tobacco supplied with ¹⁵ N[J].Part Physiol,1957,32(2):86-92.
- [2] YASUMISU N.Study on the chemical regulation of alkaloid biosynthesis into tobacco plants.II Inhibition of alkaloid biosynthesis by exogenous auxins[J].Agr Bd Chem,1967,31:1441-1447.
- [3] ATKINSON WO,KASPERBAUER J.Influence of sublethal foliar application of 2,4-D on burley tobacco yield and composition[J].Agron J,1970,62:421-424.
- [4] 简永兴,杨磊,谢龙杰,等.GA3对烤烟品种新K326上部烟叶农艺性状及烟碱含量的影响[J].湖南农业大学学报,2005,28(1):79-83.
- [5] 杨怀玉,李春俭.顶端调控对烤烟生长、主要矿质养分吸收和分配特性的影响[J].中国农业科学,2006,39(9):1846-1852.
- [6] 洪丽芳,付丽波,赵宗胜,等.烤烟钾素源库关系生理调控措施研究[J].植物营养与肥料学报,2001,7(4):404-409.
- [7] 洪丽芳,付利波,苏帆,等.生长素对烟株中钾的分配和积累影响[J].作物学报,2003,29(3):457-461.
- [8] 赵正雄,杨宇虹,张福锁,等.不同顶端调控措施对烟株内钾素积累和分配规律的影响[J].烟草科技,2002(6):37-39.
- [9] 和丽忠,张晓林,陈锦玉,等.生长调节物质对烤烟增钾控氮的作用及其对烟叶品质的影响[J].中国农学通报,2001,17(4):10-14.
- [10] 徐晓燕,王华松,武雪萍.施肥及生长调节剂对烟草烟碱和钾含量的影响[J].山西农业大学学报,2002,22(1):18-21.
- [11] 招启柏,王宏武,王广志,等.外源调节物质对烤烟烟碱含量的影响[J].烟草农业科学,2006,2(4):385-389.

- [12] 王丰吉,陈朝阳,高文霞,等.外源化学物质调节烟碱生物合成机理.外源化学物质对烟碱生物合成中间产物的影响[J].福建农林大学学报:自然科学版,2006,35(1):11-16.
- [13] 韩锦峰,朱大恒,林学梧,等.多胺对烟株生长发育及烤烟产质的生理效应[J].烟草学刊,1991(2):1-8.
- [14] 韩锦峰,齐群钢,张秀梅.表油菜素内酯对烟株生长发育和烟叶产质生理效应及其在烤烟中应用[J].烟草学报,1994(1):1-15.
- [15] 江力,王东胜,王能如,等.6-苄基腺嘌呤和脱落酸对不同发育阶段烟草叶片光合功能及过氧化氢水平的调控[J].中国烟草学报,2006,12(5):38-42.
- [16] 李浩亮,史金钟,何登峰,等.外源赤霉素对烤烟叶片生长和品质的影响[J].河南农业科学,2006(4):51-54.
- [17] 史金钟,赵东方,张凤霞,等.不同调控措施对烟叶钾素调节效应研究初报[J].河南农业科学,2007(7):39-41,47.
- [18] 史金钟,赵东方,李浩亮,等.外源赤霉素对旱区烤烟叶片生长和品质的影响[J].中国农学通报,2007,23(5):221-225.
- [19] 赵东方,马永建,王维超,等.不同营养调控措施对烟叶钾素与烟碱调节效应的研究[J].安徽农业科学,2007,35(31):9942-9944.
- [20] BIERHUIZEN J F,SLATER RO.Effect of atmospheric concentration of water vapor and CO₂ on determining transpiration-photosynthesis relationships of cotton leaves[J].Agric Meteorol,1965,2:259-270.
- [21] 武雪萍,钟秀明,秦艳青,等.芝麻饼肥与化肥不同比例配施对烟叶香气质量的影响[J].作物学报,2006,32(10):1554-1559.
- [22] 张荣铨,戴新宾,许晓明,等.叶片光合功能期与作物光合生产潜力[M]// 姜成后,王学臣.作物产量形成的生物学基础.北京:中国农业出版社,2001:52-63.
- [23] 王少先,李再军,王学云,等.不同品种光合特性比较研究初报[J].中国农学通报,2005,21(5):245-247,252.
- [24] 韩富根,刘学芝,汪耀富,等.抗旱栽培综合技术对烤烟光合特性和水分利用效率的影响[J].河南农业大学学报,2003,37(4):352-356.
- [25] ZHANG F,KONG X S,ZHANG M X,et al.Effects of water stress on photosynthesis and fluorescence characteristics in peony[J].Agricultural Science & Technology,2008,9(2):101-105.

(上接第14400页)

月份冷害的影响,NR活性显著下降;3月份时NR活性最低,生长处于停滞状态;4月份后NR活性逐渐恢复。

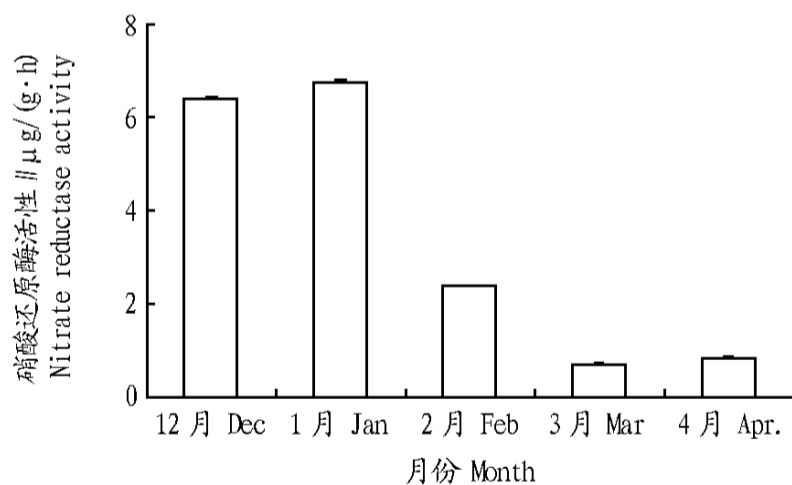


图4 不同月份硝酸还原酶活性差异

Fig.4 The difference of nitrate reductase activity among different months

3 结论与讨论

(1) 植物受到低温影响时,细胞的质膜透性会发生不同程度地增大,电解质会有不同程度地外渗,以致于电导率、伤害度会有不同程度地增大。互叶白千层叶的伤害度在1月和2月经历冷害时较低,表明冷害对互叶白千层影响不大。

(2) POD的产生是植物在面临逆境时产生的抵抗机制之一,互叶白千层POD活性在1月份和2月份经历冷害时较高,说明互叶白千层启动了相应的抵抗机制。

植物器官衰老或在逆境下遭受伤害,往往发生膜质过氧化作用,MDA是膜质过氧化的最终分解产物,其主要作用是破坏植物细胞膜系统,是研究植物抗性的一个重要的生理

指标。该研究中,MDA含量在1月份和2月份经历冷害时并没有增高,说明冷害对互叶白千层MDA含量没有显著影响,针叶的膜质过氧化程度并不严重。NR活性主要反映了植株的生长活力,从12月份到3月份持续下降,4月份略有回升,反映了冷害对互叶白千层的生长速度有明显影响。

(3) 由表型性状来看,3月份时伤害最为明显,表现为嫩梢前期枯黄,后期枯死,成熟叶片受害较轻,叶片出现褐色的斑点,此时互叶白千层的生长基本处于停滞状态;4月份后生长逐渐恢复。综合表型性状和生理指标的变化表明,互叶白千层具有较强的抵御长时间低温冷害的能力。

参考文献

- [1] 张孝祺,林雄,吴玉璧,等.广东互叶白千层茶树油产品主要成分的质量标准研究[J].广东化工,2006(6):13-16.
- [2] 张燕君,古佛政.互叶白千层精油的组分及抗菌作用[J].广东林业科技,1998,14(2):31-34.
- [3] 常新民,黄耀恒.互叶白千层育苗技术[J].林业科技开发,2003(6):32-34.
- [4] 吕永,何庭玉,陈珊.互叶白千层植物精油的研究进展[J].广东化工,2005(3):38-40.
- [5] 吴幼媚,王以红,蔡玲,等.互叶白千层离体繁殖技术[J].广西林业科学,2001,30(2):28-29.
- [6] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2003:124-127,274-276.
- [7] 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,2006:167-168.
- [8] FUS J,XIEX J.Effect of carbohydrate content in feed on the daily metabolic rate of *S. meridionalis*[J].Agricultural Science & Technology,2008,8(3-4):73-78.
- [9] YUE C W,XIAO J,LIANG X,et al.Effect of low temperature stress on sweet potato *S. Adenosyl methionine synthetase* gene expression[J].Agricultural Science & Technology,2008,9(1):11-14,156.