

低温胁迫对长苞铁杉幼苗的生理影响

赖志华¹, 朱小龙¹, 李振基^{1*}, 王建林², 宋爱琴¹,
关少华¹, 杨伟伟¹, 郑凌峰², 蔡昌棠²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建省永安天宝岩国家级自然保护区管理局, 福建 永安 366000)

摘要: 经模拟低温(-12、-8、-4、0、4)胁迫处理后, 长苞铁杉幼苗叶片和根系相关生理指标均发生明显变化. 随着温度降低, 叶片光合色素含量增加, 但反映光合活性强弱的 Chla/Chlb 降低; 叶片中渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖含量增加, 呈极显著正相关($r=0.804, p<0.01$), 根系中可溶性糖含量的减少说明根对低温胁迫的渗透调节更依赖于脯氨酸的累积. 幼苗在-4 及更低温度胁迫下受到严重的冻害使 SOD 活性持续下降, 叶片中 POD 活性与 SOD 活性变化呈极显著负相关($r=-0.908, p<0.01$), 但根系中 POD 活性与 SOD 活性没有相关性, 说明长苞铁杉幼苗对抗外界胁迫机理的复杂性. 叶片 MDA 含量比根系低可能与叶片中 Car 能缓解¹O₂ 对细胞的伤害有关.

关键词: 长苞铁杉幼苗; 低温胁迫; 生理

中图分类号: Q 948.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)01-0122-05

长苞铁杉(*Tsuga longibracteata* Cheng) 属松科铁杉属长苞铁杉组(Sect. *Heopence* Keng et Keng f.), 是我国珍稀的古老植物, 也是第四纪冰期遗留下来的树种. 主产于贵州东北部、湖南、广东和广西北部、江西南部、福建西部, 生于海拔 800~2 000 m 中山地带, 喜温暖湿润气候和酸性红壤、山地黄棕壤, 对立地条件要求不严, 在山脊陡坡可形成纯林; 在山谷土壤深厚、肥沃的立地条件下可长成大树, 且形成针阔混交林, 现有资源甚少, 已列为福建省重点保护珍贵树木. 在福建省永安天宝岩国家级自然保护区内的天宝岩海拔 1 200 m 处保存有一片完好的以长苞铁杉为优势种的原生性针叶林, 面积达到 186.7 hm², 是该保护区的特色森林生态系统类型之一^[1]. 通过对不同低温环境中长苞铁杉幼苗叶片光合色素系统、叶片和根系的膜氧化产物、抗氧化酶活性、渗透调节物质等问题展开研究, 可以为长苞铁杉幼苗对冬季低温环境的适应生理生态学研究提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 采样地自然概况

福建省永安天宝岩国家级自然保护区位于福建省永安市东部, 地理坐标为东经 117°28'03"~117°35'28", 北纬 25°50'51"~26°01'20", 面积 11 015.38 hm²,

海拔 580~1 604.8 m. 区内气候属于中亚热带东南季风气候, 年平均气温为 15℃, 最冷月(1 月)均温 5℃, 最热月(7 月)均温 23℃, 极端最低温 -11℃, 极端最高温 40℃, 无霜期 290 d 左右, 平均降水量 2 039 mm, 空气湿度较高, 各月平均在 80% 以上^[2-3].

1.2 材料培养与处理

长苞铁杉与毛竹混交林中长苞铁杉幼苗天然更新良好^[4], 采集当年生实生苗, 苗高 4~5 cm, 用营养袋(7×11 cm)培养. 所用土壤为长苞铁杉与毛竹混交林下土, 土壤理化性质: pH 5.25, 全 N 含量 0.625 mg/g, 总 P 含量 0.228 mg/g, K 含量 7.89 mg/g.

幼苗按表 1 在人工气候箱经 7 d 抗寒锻炼(光照强度 3 000 lx, 湿度 80%)后, 于夜间分组进行连续 8 h(22:00~6:00)低温胁迫(Low temperature stress, LTS)试验, 温度梯度设置为 4(对照组)、0、-4、-8、-12℃, 每个梯度设 3 个重复, 第 2 天取成熟叶片和根系进行相关生理指标的测定.

1.3 测定方法

叶绿素(Chl)含量测定采用 Arnon 法^[5]: 称取 0.1 g 叶片, 80% 丙酮浸泡至叶片无色. 分别测定浸提液在 663、645、445 nm 的 OD 值.

可溶性糖(Soluble sugar)含量测定参照李合生的方法^[6]: 材料(叶片/根)称取 0.2 g, 加入蒸馏水后沸水浴提取, 提取液过滤; 上清液加入蒽酮乙酸乙酯和浓硫酸, 充分振荡后沸水浴; 冷却至室温测定 OD₆₃₀.

游离脯氨酸(Proline)含量参照张殿忠等的方法^[7]: 材料(叶片/根)称取 0.5 g, 加磺基水杨酸后沸水

收稿日期: 2007-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(30370275)资助

* 通讯作者: zhenjil@163.com

表 1 长苞铁杉幼苗的抗寒锻炼

Tab. 1 Cold acclimation in seeding of *Tsuga longibracteata*

时间	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
温度()	10	9	8	7	6	5	4

表 2 低温胁迫对长苞铁杉光合色素含量及其比例的影响

Tab. 2 Effects of L TS on the content and ratio of photosynthetic pigments of *Tsuga longibracteata*

t/	Chla/ (mg · g ⁻¹)	Chlb/ (mg · g ⁻¹)	Chl/ (mg · g ⁻¹)	Car/ (mg · g ⁻¹)	Chla/ Chlb	Car/ Chl
- 12	1. 235 ±0. 104	0. 322 ±0. 023	1. 557 ±0. 126	0. 278 ±0. 020	3. 839 ±0. 128	0. 179 ±0. 002
- 8	1. 332 ±0. 130	0. 323 ±0. 029	1. 645 ±0. 157	0. 312 ±0. 005	4. 086 ±0. 144	0. 191 ±0. 016
- 4	1. 088 ±0. 092	0. 254 ±0. 015	1. 342 ±0. 102	0. 274 ±0. 011	4. 288 ±0. 267	0. 205 ±0. 009
0	0. 862 ±0. 109	0. 184 ±0. 062	1. 046 ±0. 170	0. 202 ±0. 021	4. 235 ±0. 183	0. 195 ±0. 015
4	0. 889 ±0. 080	0. 198 ±0. 015	1. 087 ±0. 094	0. 215 ±0. 023	4. 480 ±0. 095	0. 198 ±0. 005

浴 10 min;冷却后取上清液加入酸性茚三酮,沸水浴 40 min;用甲苯萃取,测定 OD₅₂₀。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性、可溶性蛋白质含量的测定:材料(叶片/根)称取 0.2 g,酶提取液冰浴研磨匀浆,4 离心,上清液即为粗酶液。SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[8];POD 活性测定采用愈创木酚法^[9];可溶性蛋白质含量采用考马氏亮蓝 G-250 染色法^[10]。

丙二醛(MDA)含量参照 Heath 和 Packer 的方法^[11]:材料(叶片/根)称取 0.2 g,10% TCA 4 mL 和少量石英沙研磨至匀浆后离心,取上清液加入 TBA 后沸水浴,冷却 4 离心;取上清液测定 532、600、450 nm 的 OD 值。

幼苗根和叶在 105 杀青 15 min 后于 85 中烘干至恒量,测定材料含水量。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对幼苗叶片叶绿素含量及比例的影响

低温对长苞铁杉幼苗叶绿素含量及其比例的影响如表 2 所示,结果为:叶绿素 a (Chla) 含量在 0 和 - 4 处理时与对照无显著差异($p > 0.05$),在 - 8 和 - 12 低温处理时比对照分别增加 48.8% ($p < 0.05$) 和 39.0% ($p < 0.01$),且 - 8 和 - 12 之间差异不显著($p > 0.05$);叶绿素 b (Chlb) 含量变化趋势与 Chla 相似;零下低温处理(- 4、- 8 和 - 12)使总叶绿素(Chl)含量增加且影响显著($p < 0.05$),0 处理时,叶绿素含量 1.046 mg/g (fm),比对照 1.087 mg/g (fm) 减少 3.9%,但方差分析显示,差异不显著;0 时类胡萝卜素(Car)含量与对照无显著差异,- 4、- 8 和

- 12 比对照分别增加了 27.2%、45.0% 和 29.1% ($p < 0.05$),且这 3 个温度梯度之间差异不显著;Chla/Chlb 值随温度的降低呈减小趋势,方差分析显示,只有在 - 12 时 Chla/Chlb 值与对照有显著差异($p < 0.05$);温度胁迫对 Car/Chl 影响不显著($p > 0.05$)。

2.2 低温胁迫对幼苗渗透调节物质的影响

随着温度的降低,叶片中的可溶性糖含量呈上升趋势(图 1A),差异达极显著水平($p < 0.01$),其中 0 和 - 12 处理可溶性糖含量分别比对照组增加 15.0% 和 38.4%,但 0、- 4 和 - 8 处理之间差异不显著($p > 0.05$)。而根中的可溶性糖含量变化随温度降低呈现下降趋势,各处理与对照之间差异都极显著($p < 0.01$),- 8 处理可溶性糖含量最低,只有对照的 65.7%;叶片可溶性糖含量都比根系高。

脯氨酸(Pro)是多种植物体内有效的一种亲和性渗透调节物质,对于某些植物而言,几乎所有的逆境(包括干旱、低温、高温、冰冻、盐害等)都可以造成体内脯氨酸的累积。从图 1B 可见,叶片中脯氨酸含量随温度的降低逐渐增加且极差异显著($p < 0.01$),- 4、- 8 和 - 12 处理脯氨酸含量分别为对照的 2.29、2.13 和 2.48 倍,但这 3 个处理之间差异不显著($p > 0.05$)。0 处理根系脯氨酸含量比对照减少了 3.9%,但差异不显著,- 4 和 - 8 处理与对照差异也不显著,当温度降低到 - 12 处理时,脯氨酸含量达到 489.84 μg/g (dm),为对照的 1.97 倍,且差异达到极显著水平($p < 0.01$)。

2.3 低温胁迫对幼苗抗氧化酶系的影响

叶片 SOD 活性变化见图 2A,与对照组 4 处理相比,- 4 处理叶片中的 SOD 活性增加了 2.03%,但差异不显著($p > 0.05$),其他 0、- 8 和 - 12 处理组

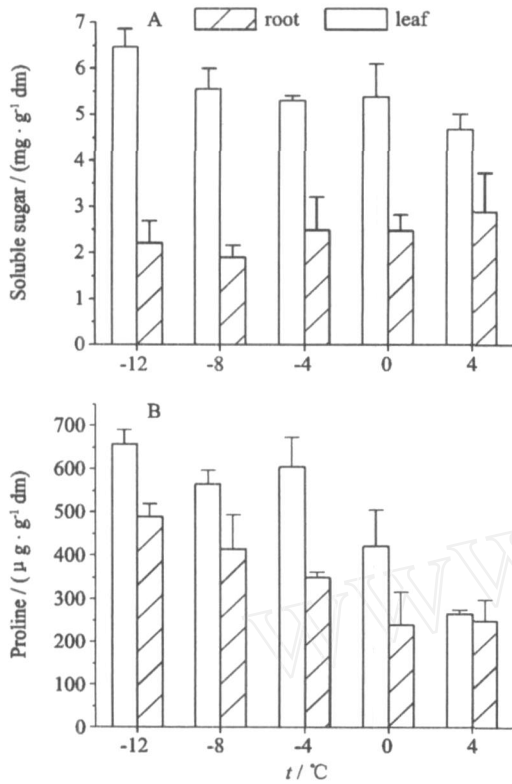


图 1 低温胁迫对长苞铁杉根和叶可溶性糖和脯氨酸含量的影响

Fig. 1 Effects of L TS on the content of sugar and proline on root and leaf of *Tsuga longibracteata*

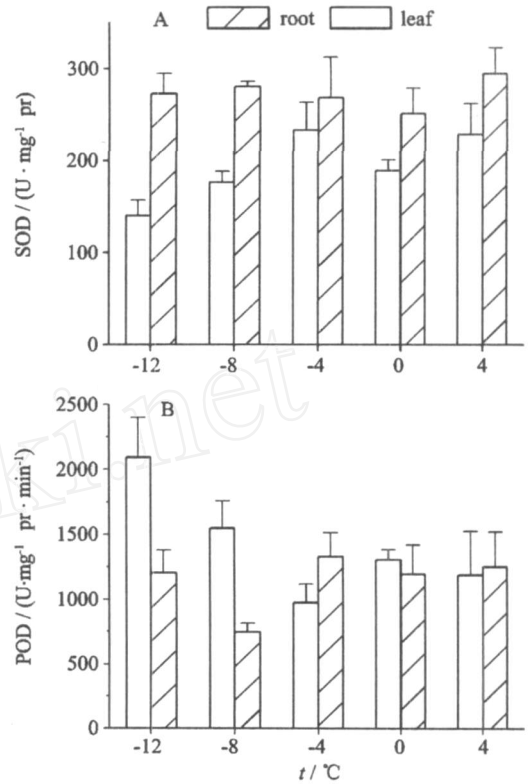


图 2 低温胁迫对长苞铁杉根和叶 SOD 和 POD 活性的影响

Fig. 2 Effects of L TS on the SOD and POD activity root and leaf of *Tsuga longibracteata*

SOD 活性均比对照低,分别为对照的 82.8%、77.3% 和 61.5%,差异达显著水平 ($p < 0.05$). 根系 SOD 活性随温度的降低变化比较复杂,呈现先降低后升高再降低的变化趋势,0 处理 SOD 活性为对照的 85.2%,差异显著 ($p < 0.05$),其他各处理之间差异不显著 ($p > 0.05$).

POD 活性变化如图 2B 所示,0 处理叶片 POD 活性比对照有所增加,但差异不显著 ($p > 0.05$); - 8 和 - 12 处理 POD 活性分别是对照的 1.30 和 1.76 倍,且差异达到极显著水平 ($p < 0.01$); - 4 处理 POD 活性只有对照的 81.9%. 根系 - 4 处理 POD 活性 1329.01 U / (mg(pr) · min) 比 4 对照 1247.53 U / (mg(pr) · min) 增加 6.5%,但差异不显著;其他各处理与对照相比都有所降低,- 8 处理 POD 活性最低,为 746.28 U / (mg(pr) · min).

2.4 低温胁迫对幼苗膜氧化伤害产物丙二醛 (MDA) 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化作用的最终产物,是膜系统受伤害的重要标志之一^[7]. 长苞铁杉幼苗 MDA 含量变化如图 3 所示,温度降低到 0 时叶片中的 MDA 含量比对照增加了 11.3%,差异达显著水平 ($p < 0.05$);随

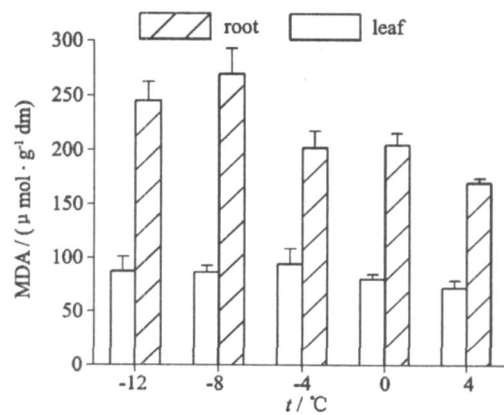


图 3 低温胁迫对长苞铁杉根和叶 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of L TS on the content of MDA on root and leaf of *Tsuga longibracteata*

温度的进一步降低,膜脂过氧化作用加强,MDA 含量都比对照高,经方差分析,差异极显著 ($p < 0.01$). 经方差分析结果表明,根系中的 MDA 含量变化在 0 处理时 MDA 含量比对照增加 13.4%,但差异不显著 ($p > 0.05$);随着温度降低,- 4 处理 MDA 含量比对照增加 19.2%,且差异达到显著水平 ($p < 0.05$); - 8 和 - 12 处理的 MDA 含量虽然比对照分别增加 59.1%

和 44.6%, 差异极显著 ($p < 0.01$), -12 处理时的 MDA 含量虽然比 -8 处理时下降了, 但是两者之间没有差异 ($p > 0.05$)。

3 讨 论

叶片中的光合色素是叶片光合作用的物质基础, 环境因子的改变可以引起光合色素的变化, 大多数植物在低温情况下叶绿素会受到一定的破坏, 光合速率也明显下降, 但也有例外, 高山的毛桦在低温期间光合速率大于低地的同一植物^[12]。本实验出现了长苞铁杉幼苗在低温胁迫时 Chla、Chlb 和 Chl 含量比对照高, 说明长苞铁杉幼苗在一定的低温范围内仍然能够保持较好的生长状况和叶片的光合能力, 从而表现出对冻害的一种抵抗力。Chla/Chlb 值的变化能反映叶片光合活性的强弱^[13], 低温胁迫下虽然 Chla、Chlb 和 Chl 含量比对照高, 但光合活性降低了。Car/Chl 值的高低与植物忍受逆境的能力有关, 进而引起光合功能的改变^[14]。本实验中 Car/Chl 值随温度变化没有显著差异, 说明长苞铁杉幼苗对于低温胁迫有较强的耐受性。

维持质膜稳定性对细胞进行生命活动起到直接影响作用, 而植物的抗冷性与质膜组成、结构及功能稳定性有关^[15]。低温胁迫导致某些物质如脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白质含量升高以加强质膜稳定性, 提高细胞耐脱水能力^[16-17]。本试验中, 叶片可溶性糖和脯氨酸含量都随温度的降低大量积累, 加强渗透调控能力以维持叶片质膜稳定性, 且二者呈现极显著正相关 ($r = 0.804, p < 0.01$); 在达到 -4 及更低温度情况下, 长苞铁杉幼苗叶片中脯氨酸含量达到一定水平, 起到了渗透调节的作用。根系可溶性糖含量随温度的降低而下降, 但变化幅度较小, 而脯氨酸含量的累积随温度的变化较为敏感, 脯氨酸可能更适合作为长苞铁杉幼苗根系的抗寒指标。

低温胁迫下细胞内自由基代谢平衡被破坏导致自由基不能被及时清除, 过剩自由基的毒害之一是引发或加剧膜脂过氧化作用, 造成细胞膜系统的损伤^[18]。SOD 和 POD 能清除组织中的自由基, 对膜起保护作用。低温逆境中 SOD、POD 活性水平与植物的抗寒性强弱有着十分密切的关系, 并可以作为植物抗寒性检测的生理指标^[19]。本研究表明, 长苞铁杉幼苗经过低温锻炼叶片后抗寒能力有所加强, 但温度降到零下低温 -4 后, 细胞膜活性发生严重膜脂过氧化作用, 幼苗受到比较严重的冻害, 从而使 SOD 活性持续下降。叶片中 POD 活性变化与 SOD 活性变化呈极显著负相关 ($r = -0.908, p < 0.01$), 但根系中 POD 活性与 SOD 活性没有相关性, 叶片和根系对低温胁迫的调节

及防御方式不同。

低温下 SOD 活性下降使细胞内自由基增加, 而 POD 活性的下降则使 H_2O_2 不能有效清除, 使 MDA 含量增加^[20]。本实验研究表明, 长苞铁杉幼苗叶片中 MDA 含量随温度的降低而增加, -12 时 MDA 含量的减少, 叶片可能已部分受伤; 根系 MDA 含量与 POD 含量呈极显著负相关 ($r = -0.696, p < 0.01$), 而与 SOD 活性没有相关性。叶片比根系中 MDA 含量低可能与叶片中 Car 能缓解¹ O_2 对细胞的伤害有关^[21]。长苞铁杉幼苗在低温胁迫下叶片和根系对细胞膜系统稳定性具有不同的调控方式。

参考文献:

- [1] 郑凌峰. 长苞铁杉的生态生物学特性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4): 59 - 60.
- [2] 林鹏, 主编. 福建植被[M]. 福建: 福建科学技术出版社, 1990.
- [3] 李振基, 陈鹭真, 张宜辉, 等. (福建天宝岩自然保护区) 植被资源[M]//林鹏, 主编. 福建天宝岩自然保护区综合科学考察报告. 厦门: 厦门大学出版社, 2002: 87 - 130.
- [4] 朱小龙. 长苞铁杉天然更新生态学研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2006: 42 - 48.
- [5] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiol, 1949, 24: 1 - 15.
- [6] 李合生, 主编. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 389 - 438.
- [7] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离 Pro 含量的方法[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(4): 62 - 64.
- [8] 王爱国, 罗广华, 邵从本. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983(9): 77 - 84.
- [9] 陈少裕. 膜脂过氧化与植物逆境胁迫[J]. 植物学通报, 1989, 6(4): 211 - 217.
- [10] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [11] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts, I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125: 189 - 198.
- [12] 何洁, 刘鸿先, 王以柔, 等. 低温与植物的光合作用[J]. 植物生理学通讯, 1986, 22(2): 1 - 6.
- [13] 米海莉, 许兴, 李树华, 等. 水分胁迫对牛心朴子、甘草叶片色素、可溶性糖、淀粉含量及碳氮比的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1816 - 1821.
- [14] 朱新广, 张其德. NaCl 对光合作用的影响[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 332 - 338.
- [15] 简令成. 生物膜与植物寒害和抗寒性的关系[J]. 植物学通报, 1983, 1(1): 17 - 23.

- [16] 柴团耀,张玉秀. 菜豆富含脯氨酸、蛋白质基因在生物和非生物胁迫下的表达[J]. 植物学报,1999,41(1):111-113.
- [17] 艾希珍,于贤昌. 低温胁迫下黄瓜嫁接苗与自根苗某些物质含量变化[J]. 植物生理学通讯,1999,35(1):26-28.
- [18] Elstner E F. Oxygen activation and toxicity [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Molec Biol,1982,33:73-76.
- [19] Foyer C H, Descourvieres P, Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants[J]. Plant Cell Environ,1994,17:507-523.
- [20] 李美茹,刘鸿先,王以柔,等. 水稻冷锻炼过程中钙的效应[J]. 植物学报,1996,38(9):735-742.
- [21] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1999:52-95.

Effects of Low Temperature Stresse on *Tsuga longibracteata* Seedlings

LAI Zhi-hua¹, ZHU Xiao-long¹, LI Zhen-ji^{1*}, WANG Jian-lin²,
SONG Ai-qin¹, GUAN Shao-hua¹, YANG Wei-wei¹,
ZHENG Ling-feng², CAI Chang-tang²

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Administration of Yong an Tianbaoyan National Natural Reserve of Fujian, Yong an 366000, China)

Abstract : The activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), content of photosynthetic pigment, proline, soluble sugar and malondialdehyde (MDA) in the leaves and roots of *Tsuga longibracteata* seedling were studied under the simulate low temperature stress (-12, -8, -4, 0, 4). The experimental results indicate that with decreasing temperature, content of photosynthetic pigment in leaf increased, but the ratio of chlorophyll a and chlorophyll b (Chla/Chlb) which reflected activity of photosynthesis reduced. There is positive correlation between proline and soluble sugar which increase in the leaves ($r=0.804, p<0.01$). Moreover, osmoregulation in the roots depend on cumulation of proline because of the decrease of soluble sugar. The activity of SOD in the seedling leaves declined gradually blow -4. There is a positive correlation between the activities of SOD and POD ($r=-0.908, p<0.01$) in leaf, but without correlation in the root. It also show the complexity of mechanism which the seedling of *Tsuga longibracteata* resist the environment stress. Lower content of MDA in leaf may due to the increase of carotenoid (Car) which decrease injury of cell by 1O_2 .

Key words : *Tsuga longibracteata* seedlings; low temperature stressed; physiology