

低温胁迫对竹子 3 种渗透调节物质的影响

徐传保, 戴庆敏

(丽水学院 化学与生命科学学院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 以 8 种竹子离体叶片为材料进行低温胁迫试验, 研究低温胁迫对竹子 3 种渗透调节物质含量的影响。结果表明: 低温胁迫导致竹子叶片组织中可溶性蛋白、可溶性糖及游离脯氨酸含量均有明显变化。- 25℃条件下, 8 个供试竹种可溶性蛋白为 2.37~ 5.18 mg/g、可溶性糖为 21.22~ 52.27 mg/g、游离脯氨酸为 139.75~ 1213.89 μg/g。对试验结果进行方差分析和多重比较结果显示: 温度间可溶性蛋白、可溶性糖及游离脯氨酸含量差异均达到极显著水平, 品种间可溶性蛋白质、可溶性糖含量差异不显著, 游离脯氨酸含量差异极显著, 且抗寒性强的品种叶片中 3 种渗透调节物质的含量均较抗寒性弱的品种高。

关键词: 竹子; 低温胁迫; 可溶性蛋白; 可溶性糖; 游离脯氨酸

中图分类号: S795 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)01-0127-04

Changes of Three Osmotic Regulatory Metabolites Contents in Leaves of Bamboo under Low Temperature Stress

XU Chuan-bao, DAI Qing-min

(College of Chemistry and Life Sciences, Lishui University, Lishui 323000, China)

Abstract: The changes of contents of three osmotic regulatory metabolites in leaves from eight bamboo species under low temperature stress were studied. The results showed that the contents of soluble protein, soluble sugar and proline in leaves of bamboo changed significantly under low temperature stress. Under - 25℃, the range of soluble protein content was 2.37- 5.18 mg/g, the soluble sugar was 21.22- 52.27 mg/g, and the proline was 139.75- 1213.89 μg/g of eight bamboo species. The result of ANOVA and multi-comparison showed that the contents of soluble protein, soluble sugar and proline had significant changes under the different temperature, and the content of soluble protein and soluble sugar of the different varieties had not significant difference, but the contents of proline from the different varieties had significant difference. The contents of three osmotic regulatory metabolites in leaves from the cold-resistance varieties were higher than that of the others.

Key words: Bamboo; Low temperature stress; Soluble protein; Soluble sugar; Proline

竹子为禾本科 (Gramineae) 竹亚科 (Bambusoideae) 的多年生常绿植物, 是极其重要的可再生资源, 也是重要的园林绿化植物。竹子与其他植物相比能多释放 35% 的氧气, 对净化空气、稳定地球大气成分起到重要的作用, 有的生态学家曾呼“让竹子来拯救地球!”^[1]。我国现有竹种 37 属 500 余种, 分隶 6 族^[2]。但由于受气温的影响, 大部分竹

种在分布上具有明显的地带性和区域性。在我国, 竹子的栽培区域主要集中在南方, 其中福建、江西、浙江、湖南四省为竹子主要产区。虽然南竹北引工作长期受到人们的关注^[3], 但对竹子的抗寒机制研究非常少, 大部分学者只是对竹子的冻害做了外观形态的调查。黄衍串等^[4]、朱勇等^[5]、赵凡等^[6]、纪成据^[7]、孙守家等^[8]简单了解了竹子的生长范围, 但

收稿日期: 2010-09-10
基金项目: 丽水学院人才引进项目(2009025)
作者简介: 徐传保(1981-), 男, 山东济南人, 助理实验师, 硕士, 主要从事园林植物种质资源和栽培生理研究。
E-mail: xcb12345@126.com

没有从生理上分析竹子受冻害的机制。本试验研究了低温胁迫对 8 种竹类植物体内 3 种渗透调节物质的影响,旨在为进一步研究竹子抗寒性提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料是刚竹属的 8 个竹种(变种),分别为桂竹、斑竹、黄竿京竹、黄槽竹、淡竹、安吉水胖竹、寿竹、蓉城竹,栽植在山东省泰山林业科学研究院竹子引种基地。基地土壤为砂壤土,土层厚度 80 cm,土壤 pH 值 6.4~6.6,呈中酸性。土壤有机质为 8.6 g/kg,有效 N 为 71.1 mg/kg,有效 P 为 11.4 mg/kg,有效 K 为 59.0 mg/kg。利用电导法配合 Logistic 方程确定试验竹种的半致死温度,结果显示,黄竿京竹、淡竹、黄槽竹、安吉水胖竹较桂竹、寿竹、蓉城竹、斑竹抗寒性强。

1.2 方法

1.2.1 低温处理方法 试验材料取样时间参考黄华涛等^[9]的方法,采样参照朱海根等^[10]的方法。于 2009 年 11 月 20 日上午 8:00–9:00 分别在健壮植株中部向南枝条取叶,叶片采摘后立即用潮湿纱布包裹,装入密封的塑料袋中,带回实验室。分别用自来水、去离子水冲洗,用吸水纸吸干水分。将每个材料的叶片分成 6 份,放入密封的塑料袋中。分装好的叶片置于 YT-10C 型超级恒温循环器中,试验设 0℃、-5℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃ 6 个温度梯度,将需采取温度处理的试验材料先在 2℃预冷 2 h,然后开始降温,降温速度为 10℃/h,到达设定温度后停留 12 h,然后再继续降温,即从 2℃降至 0℃,在 0℃停留 12 h,取出第 1 组材料,其余继续降温至 -5℃,停留 12 h 后取出第 2 组材料,以此类推,直至降温到 -25℃。降温处理后的材料取出后置于 2℃冰箱中解冻 12 h 后,备用。

1.2.2 可溶性蛋白的测定 利用牛血清蛋白标准溶液制作蛋白质标准曲线,并根据标准曲线求出标准线性方程为: $y = 0.0059x + 0.035$, 其中 y 为 595 nm 下的吸光度值, x 为牛血清蛋白质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。可溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝法^[11]:称取样品 0.5 g,用 5 mL 蒸馏水或缓冲液研磨提取。吸取样品提取液 1.0 mL 放入具塞试管中(每个样品设置 2 个重复),加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,充分混合,放置 2 min 后在 595 nm 下比色,记录吸光值。从标准方程中求出提取液中蛋白质含量,然后按下式计算出样品中的蛋白质含量。样品蛋白质含量(mg/g) = 查标准曲线值(μg) × 提

取液总体积(mL) × 1000 / (测定时加样量(mL) × 样品鲜质量(g))。

1.2.3 可溶性糖的测定 利用葡萄糖标准溶液制作葡萄糖标准曲线,并根据标准曲线求出标准线性方程为: $y = 0.0050x + 0.06083$, 其中 y 为 630 nm 下的吸光度值, x 为糖质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。可溶性糖含量的测定采用蒽酮法^[12]:称取 0.5 g 样品加入 10 mL 蒸馏水,塑料薄膜封口,于沸水浴提取 30 min (提取 3 次),提取液滤入 50 mL 容量瓶中,反复冲洗试管及残渣,定容至刻度。吸取提取液 0.5 mL 于 20 mL 刻度试管中(重复 3 次),加蒸馏水 1.5 mL,再加 0.5 mL 蒽酮乙酸乙酯试剂和 5 mL 浓 H_2SO_4 ,充分振荡,立即加入沸水浴准确保温 1 min,自然冷却至室温,以空白作参比,630 nm 比色。从标准方程中求出提取液含糖量,然后按下式计算出组织含糖量。可溶性糖含量(mg/g) = 标准方程求得糖质量(μg) × 提取液量(mL) × 稀释倍数 × 1000 / (吸取样品液体积(mL) × 组织鲜质量(g))。

1.2.4 游离脯氨酸的测定 利用的脯氨酸标准溶液制作脯氨酸标准曲线,并根据标准曲线求出标准线性方程为: $y = 0.02694x - 0.00419$, 其中 y 为 520 nm 下的吸光度值, x 为脯氨酸质量浓度 μg 。游离脯氨酸含量的测定采用茚三酮法^[11]:称不同处理的剪碎混匀的叶片样品 0.5 g,分别置于大试管中,加入 5 mL 3% 茚三酮水杨酸溶液,管口加盖玻璃球,于沸水浴中浸提 10 min。待冷却至室温后,吸取上清液 2 mL,加 2 mL 冰乙酸和 3 mL 显色液(2.5% 酸性茚三酮),于沸水浴中加热 40 min。取出冷却后向各管加入 5 mL 甲苯充分振荡,以萃取红色物质。静置待分层后吸取甲苯层,以空白管为对照,在波长 520 nm 下比色测定。从标准方程中求出提取液中脯氨酸含量,然后按下式计算出组织脯氨酸含量。脯氨酸含量(mg/g) = 提取液中脯氨酸质量(mg) × 提取液总体积(mL) × 1000 / (测定时所吸取提取液的总体积(mL) × 样品质量(g))。用 Microsoft Excel 2003 和 DPS 3.01 软件对数据进行计算和比较分析。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对竹子叶片可溶性蛋白含量的影响

从图 1 可知,竹子叶片可溶性蛋白含量变化虽有所不同,但均在 -15℃ 达到最大值,斑竹、桂竹、黄竿京竹、黄槽竹、安吉水胖竹、蓉城竹、寿竹、淡竹的含量为 5.17 mg/g、5.38 mg/g、5.62 mg/g、5.64 mg/g、5.44 mg/g、5.34 mg/g、5.31 mg/g、5.42 mg/g,分别是 0℃ 的 1.15 倍、1.22 倍、1.23 倍、1.14 倍、1.19 倍、

1.19 倍、1.11 倍、1.09 倍。当胁迫温度降至- 25 ℃ 时,黄竿京竹可溶性蛋白含量为5.177 mg/g,较 0 ℃ 增加了 0.607 mg/g,而此时斑竹的可溶性蛋白含量为 2.374 mg/g,较 0 ℃ 时减少了 2.123 mg/g。对不同品种叶片的可溶性蛋白含量进行方差分析,结果表明, $\text{Sig} = 0.000 < 0.01$, 且 $F_A = 13.584 > F_{0.01(5,35)} = 3.592$,说明温度间可溶性蛋白含量差异达到极显著水平; $\text{Sig} = 0.381 > 0.05$, 且 $F_B = 1.106 < F_{0.05(7,35)} = 2.285$,说明品种间可溶性蛋白含量差异不显著。黄竿京竹可溶性蛋白含量最大,斑竹最小。

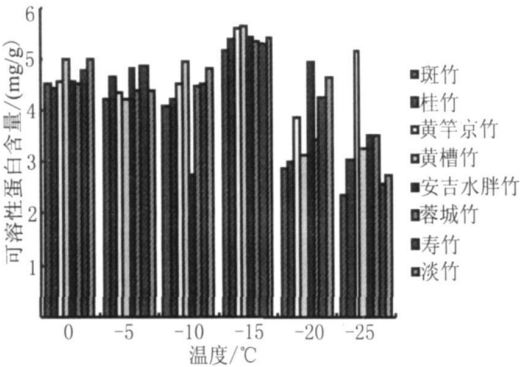


图 1 低温处理过程中竹子叶片可溶性蛋白含量变化

2.2 低温胁迫对竹子叶片可溶性糖含量的影响

由图 2 可以看出,0 ℃ 时淡竹可溶性糖含量仅为 27.729 mg/g,明显低于其他竹子。随着胁迫温度的降低,淡竹、黄竿京竹的可溶性糖含量升高,当温度降至- 25 ℃ 时,其含量分别较 0 ℃ 增加 10.35 mg/g、17.41 mg/g,其他竹子的可溶性糖含量较 0 ℃ 均降低,其中安吉水胖竹、黄槽竹和寿竹下降的幅度较小,分别降低 9.79 mg/g、7.33 mg/g、9.74 mg/g。斑竹可溶性糖含量下降幅度最大,达到- 32.472 mg/g。方差分析结果表明, $\text{Sig} = 0.097 > 0.05$, 且 $F_A = 2.040 < F_{0.05(5,35)} = 2.485$,说明温度处理间可溶性糖含量差异不显著; $\text{Sig} = 0.148 > 0.05$, 且 $F_B = 1.675 < F_{0.05(7,35)} = 2.285$,说明品种间的可溶性糖含量差异不显著。安吉水胖竹可溶性糖含量最

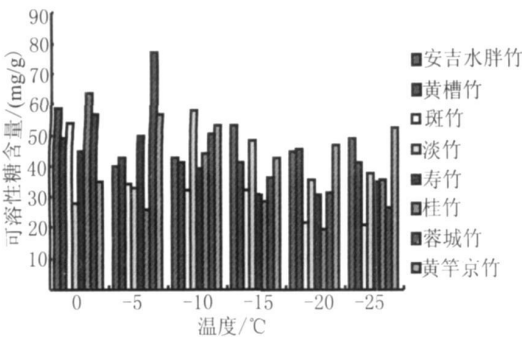


图 2 低温处理过程中竹子叶片可溶性糖含量变化

大,斑竹最小。

2.3 低温胁迫对竹子叶片游离脯氨酸含量的影响

由图 3 可知,随胁迫温度的不断降低,游离脯氨酸含量总体上呈现降-升-降的变化趋势,各品种具体变化又有所不同。0 ℃ 时供试的 8 种竹子的游离脯氨酸含量无明显差异,随着温度的降低,游离脯氨酸的含量开始降低,- 5 ℃ 黄竿京竹、淡竹游离脯氨酸含量较 0 ℃ 时有所下降但不明显,其余竹种游离脯氨酸则明显下降,降幅达 40%。当温度降至- 10 ℃ 时,除斑竹游离脯氨酸含量有所上升外,其他竹子含量均继续下降。当温度降至- 15 ℃ 时,蓉城竹、斑竹、桂竹游离脯氨酸含量下降,其余竹种则上升。随着温度继续降低,游离脯氨酸含量均继续回升,- 20 ℃ 时黄槽竹、淡竹、黄竿京竹、安吉水胖竹的游离脯氨酸含量达到最大,分别为 0 ℃ 时的 1.29 倍、1.29 倍、1.27 倍、1.09 倍。当温度达到- 25 ℃ 时,黄竿京竹和安吉水胖竹的游离脯氨酸含量较 0 ℃ 有所增加,增幅分别为 0 ℃ 时含量的 2.03%、19.13%,其他 6 种游离脯氨酸含量均较 0 ℃ 时低。蓉城竹、黄槽竹、斑竹、寿竹、桂竹、淡竹的降幅分别为 58.34%、18.82%、86.26%、69.19%、69.09%、1.64%。

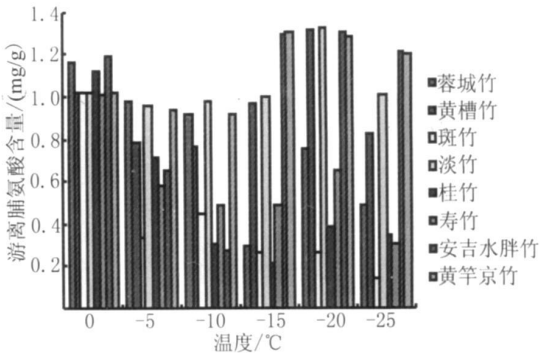


图 3 低温处理过程中竹子叶片游离脯氨酸含量变化

对不同温度处理下竹子叶片游离脯氨酸含量进行方差分析,结果表明, $\text{Sig} = 0.014 < 0.05$, 且 $F_A = 3.354 > F_{0.05(5,35)} = 2.485$,故说明温度间游离脯氨酸含量差异显著; $\text{Sig} = 0.000 < 0.01$, 且 $F_B = 6.732 > F_{0.01(7,35)} = 3.199$,故说明品种间游离脯氨酸含量差异极显著。黄竿京竹游离脯氨酸含量平均值最大,斑竹最小,且黄竿京竹、淡竹、安吉水胖竹、黄槽竹、蓉城竹间差异不显著,与寿竹、桂竹、斑竹差异显著;蓉城竹、寿竹、桂竹、斑竹间差异不显著(表略)。

3 结论与讨论

3.1 可溶性蛋白含量与抗寒性的关系

可溶性蛋白可以作为渗透调节物质、能量物质和信息传递物质在植物抵御逆境的过程中起到较大

的作用^[13]。在低温胁迫下蛋白质含量的变化研究方面所得到的结论不尽相同,出现这种情况,是由于植物的抗寒性是不稳定的,可能随时间、温度、含水量、成熟期、营养状况的不同有不同的表现^[14]。本研究表明,可溶性蛋白在低温胁迫初期表现出增加趋势,随着低温加剧,含量下降。初期可溶性蛋白的增加可能是低温锻炼下增加的可溶性蛋白质,可能包括一部分具有特异性功能的蛋白质-酶,其含量增高,使植物体内代谢旺盛,从而提高抵御不良环境的能力。可溶性蛋白含量在低温处理的前期增加,也可能是由组织内复合蛋白分解引起的。在后期低温胁迫下,可溶性蛋白含量的下降,可能是复合蛋白分解成可溶性蛋白后,因继续受低温危害,又进一步分解成氨基酸,因而可溶性蛋白又表现下降趋势。同时由于在低温下合成蛋白质的酶系统受到损害,合成蛋白质的能力下降,这也可能是导致可溶性蛋白含量下降的一个原因。从整体上来看,抗寒性强的竹子的可溶性蛋白的含量高,抗寒性弱的品种的含量低,表明可溶性蛋白含量与竹子的抗寒性密切相关。

3.2 可溶性糖含量与抗寒性的关系

可溶性糖作为植物体内的重要代谢物质,积累可以增加渗透压,提供能源和底物,诱导其他生理生化过程的进行。可溶性糖是植物体内最重要的渗透调节物质和能量物质。可溶性糖可以降低细胞的结冰温度,减轻冻害^[13]。其含量与多数植物抗寒性呈正相关,但也有植物的可溶性糖与其抗寒性无关,如甘蔗茎秆和甘薯块根^[15]。本研究发现,当低温胁迫发生时竹子的抗寒性与可溶性糖含量密切相关,抗寒性强的品种可溶性糖含量高,抗寒性弱的品种低。低温胁迫下可溶糖含量的变化反映了植物对外界低温做出防卫的能力,一定程度上可以判断其抗寒性。温度开始降低时,有些品种可溶性糖含量下降,而有些品种的可溶性糖上升,可能由于各品种抗寒反映体系反应速度不同,含量降低的品种未及时做出相应的反映,所以需要消耗贮存的可溶性糖产生能量来抗寒;随温度的继续下降,其需要增加可溶性糖的含量来抵御寒冷,因此含量上升;当温度降到一定程度,此时竹子叶片需要消耗大量的可溶性糖产生能量,因此含量降低。

3.3 游离脯氨酸含量与抗寒性的关系

脯氨酸作为一种重要的渗透调节物质,在逆境胁迫下,对植物的代谢具有调节作用^[13]。一般认为,植物体内游离脯氨酸是作为细胞质的渗透调节物质在植物对抗低温胁迫时起到平衡细胞代谢的作用,对原生质的保水能力及蛋白质胶体的稳定性有

一定的作用,而且在稳定生物大分子如酶蛋白的功能、解毒、降低冰点、增强膜中蛋白质分子间的水合力,调节渗透压及保护原生质膜等方面具有重要作用。其含量高低与植物抗冻性密切相关,有研究表明,冷锻炼植物中有游离脯氨酸的累积。在低温伤害研究中,脯氨酸是一种防冻剂或膜稳定剂。实质可能就是在冰冻期间可防止细胞由于脱水而引起的伤害。从试验结果来看,不同低温处理后,各品种叶片中的游离脯氨酸含量总体呈下降趋势,但期间也有游离脯氨酸含量增加的情况出现。温度开始降低时,各品种叶片中游离脯氨酸的含量下降,可能由于其抗寒反映体系的未做出相应的反映。对不同的品种来说含量增加出现的时间及幅度是不同的。黄竿京竹叶片中游离脯氨酸含量最大值出现时间最早(-15℃),且增幅最大,为0℃时的0.28倍。同时试验结果显示,抗寒性强的竹子叶片中游离脯氨酸含量高于抗寒性弱的品种。

参考文献:

- [1] 柯纵. 让竹子拯救地球[J]. 海峡科技, 2003(8): 27-28.
- [2] 中国科学院. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [3] 周芳纯. 竹林培育学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
- [4] 黄衍串, 黄丽莉. 竹子冻害的调查研究[J]. 西南林学院学报, 1993, 13(4): 285-288.
- [5] 朱勇, 蔡秀珠. 尤溪县园林绿化树种冻害调查[J]. 林业科技开发, 1994(1): 39-40.
- [6] 杜凡, 赵晓惠. 巨龙竹的变异类型及其引种区划的研究[J]. 竹子研究汇刊, 2001, 20(1): 20-26.
- [7] 纪成据. 1999年福建遭受极端低温冻害丛生竹调查分析[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(3): 278-282.
- [8] 孙守家, 孙明高, 魏淑芹, 等. 山东蒙山竹类引种试验初报[J]. 山东林业科技, 2002(4): 8-11.
- [9] 黄华涛, 刘祖生, 庄晚芳. 茶树抗寒性的研究[J]. 茶叶科学, 1986(1): 41-48.
- [10] 朱根海, 刘祖祺, 朱培仁. 应用 Logistic 方程确定植物组织低温半致死温度研究[J]. 南京农业大学学报, 1986(3): 11-16.
- [11] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [13] 张继澍. 植物生理学[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1999: 370-376.
- [14] 吴娜. 卫矛科三种常绿阔叶植物抗寒性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- [15] 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.