

# 低温胁迫下佛手半致死温度测定和抗寒性分析

郭卫东\*, 张真真, 蒋小韦, 陈民管, 郑建树, 陈文荣

(浙江师范大学生化学院, 浙江金华 321004)

**摘要:** 以‘青皮’和‘矮化’佛手 (*Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle) 为试材, 测定不同低温处理 24 h 后叶片的电解质外渗率 (REC), 计算半致死温度 ( $LT_{50}$ ); 在半致死温度下设置不同处理时间, 测定 REC、超氧化歧化酶 (SOD) 活性、游离脯氨酸 (Pro) 和丙二醛 (MDA) 含量, 进行抗寒性分析。结果表明: 佛手 REC 随温度降低及处理时间延长呈“S”型上升,  $LT_{50}$  在  $-4 \sim -5$  之间; 在  $LT_{50}$  下, 随着处理时间的延长 SOD 活性呈先上升后下降的趋势, Pro 和 MDA 含量逐渐上升; 12 ~ 24 h 为佛手在  $LT_{50}$  下冷害发生的临界时间。

**关键词:** 佛手; 电解质外渗率; 半致死温度; 超氧化歧化酶; 游离脯氨酸; 丙二醛

中图分类号: S 686; S 666 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 01-0081-06

## Semilethal Temperature of Fingered Citron (*Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle) under Low Temperature Stress and Evaluation on Their Cold Resistance

GUO Wei-dong\*, ZHANG Zhen-zhen, JIANG Xiao-wei, CHEN Min-guan, ZHENG Jian-shu, and CHEN Wen-rong

(College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

**Abstract:** The semilethal temperatures ( $LT_{50}$ ) of two cultivars of fingered citron (*Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle) ‘Qingpi’ and ‘Aihua’ were calculated and their resistance to low temperature stress was evaluated. The relative electric conductivity (REC) in leaves of the two cultivars were determined and their semilethal temperatures ( $LT_{50}$ ) were determined after the plants had been treated under a series of low temperatures for 24 h. Then the REC, superoxide dismutase (SOD) activity, the malondialdehyde (MDA) and free proline (Pro) contents were analyzed under  $LT_{50}$  after a serial treatment period. The results showed that the REC of the both cultivars increased following an S-curve with the temperature drop and the extension of time and the  $LT_{50}$  was between  $-4$  and  $-5$ . The activity of SOD increased at the beginning of cold treatment at  $LT_{50}$  then decreased. Contents of MDA and Pro gradually increased with the extension of time. 12 - 24 hours was considered to be a critical period for cold injury of *C. medica* under the  $LT_{50}$ .

**Key words:** fingered citron; *Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle; relative electric conductivity; semilethal temperature; superoxide dismutase; free proline; malondialdehyde

佛手 (*Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle) 是我国和东南亚地区特有的柑橘属植物, 果实形状奇特, 果端开裂成指状或拳状, 具有较高的观赏和药用价值。在我国, 佛手的栽培地主要分布在浙江、广东、广西、四川、福建等地, 其中浙江栽培的佛手与广东等地有较大差异, 具有树体较矮小, 栽培管理方便等特点, 适宜制作观赏盆景 (周春丽和郭卫东, 2005)。但佛手的抗寒力较差, 在亚热

收稿日期: 2008 - 05 - 09; 修回日期: 2008 - 12 - 10

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y307472); 浙江省新苗人才计划项目 (2007R40G2030177)

\* E-mail: gwd@zjnu.com; Tel: 0579-82282346

带及以北地区栽培时冬季需要设施保护,增加了生产成本,同时也影响了佛手的品质和产量(陈秉初和申屠文月,2003)。由于佛手特有区域的限制,国内外对其抗寒性研究还相当匮乏。因此,探讨佛手的抗寒胁迫生理,寻找提高抗寒性的新途径,对于进一步开发利用我国特有的观赏植物资源具有重要意义。

本研究中以浙江金华地区主栽佛手品种‘青皮’和经 $^{137}\text{Cs}$ 射线辐射诱变产生的佛手新株系‘矮化’(郭卫东等,2006)为试材,研究低温胁迫下电解质外渗率(REC)的变化,配合 Logistic 方程,测定其半致死温度( $L_{T_{50}}$ ),并通过分析佛手在低温胁迫下 SOD 活性、Pro 和 MDA 含量等生理指标的变化,对其抗寒性进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2007 年 9—10 月在浙江师范大学进行。从浙江师范大学佛手实验基地——浙江锦林佛手有限公司选取长势一致的两年生‘青皮’和‘矮化’佛手盆栽苗,在人工气候室进行预培养及抗寒锻炼。

参照刘祖祺等(1990)的方法,预培养温度为 20 (夜)/28 (昼),光照每天 14 h,光照强度  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,相对湿度 75%,定期浇水;预培养 3 周后在 2 d 内将温度缓慢降至 4 进行冷锻炼 7 d。

### 1.2 低温处理

冷锻炼后每个品种随机取 3 盆移入 LF-20 电脑自动控温冷库(宁波莱福公司制造),温度分别设为 0、-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7,处理 24 h,温度控制精度为  $\pm 0.1$  (用水银温度计进行校准),光照 14 h,相对湿度 75%。取完整、无病虫害的当年生春夏梢自顶向下数第 5~11 叶位的 7 张叶片用于分析测定,3 次重复。

根据朱根海等(1986)有关组织半致死温度的计算方法,配合 Logistic 方程,计算出佛手半致死温度( $L_{T_{50}}$ ),半致死温度( $L_{T_{50}}$ )下设置处理 0、12、24、36、48、60 h 取样,进行生理生化分析。单株重复 3 次。

### 1.3 测定方法

电解质外渗率(REC)的测定参考张志良(1990)的方法;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 SOD 抑制氮蓝四唑(NBT)光化还原法(Giannopolitis & Ries, 1977);丙二醛(MDA)含量测定参考刘祖祺和张石诚(1994)的方法;游离脯氨酸(Pro)含量的测定参照萧浪涛和王三根(2005)的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同低温胁迫下佛手电解质外渗率的动态变化

在 0、-1、-2 低温胁迫下两个佛手品种的叶片基本正常。-4 胁迫下多数叶片冻伤,呈现出水渍状、下垂等典型冻伤症状,1 d 后叶片卷曲、干枯。-5、-6、-7 下全部叶片冻伤。

低温处理 24 h 内,青皮、矮化佛手叶片的电解质外渗率随低温下降呈“S”型曲线变化(图 1),在高于 -4 温度处理下,叶片的电解质外渗率为 15.7%~35.3%。-4 处理下,青皮佛手叶片的电解质外渗率增加到 63.5%、矮化佛手增加到 45.4%, -5 处理下青皮和矮化佛手分别达到 86.4%和 84.2%,温度低至 -6~-7 时,变化趋势平缓。形态上观察到的佛手受冻情况与电解质外渗率的变化趋势相符。

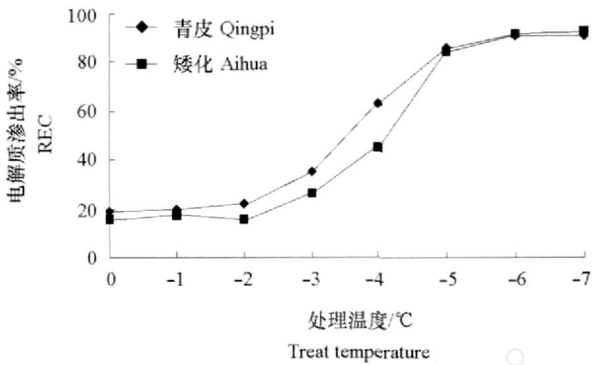


图 1 不同低温处理 24 h 后佛手叶片电解质外渗率变化

Fig 1 The relative electric conductivity of *C. medica* leaves after exposure to different low temperatures for 24 h

2.2 低温胁迫下佛手半致死温度

从图 1 可以看出，在相同处理时间里，青皮、矮化佛手叶片的电解质外渗率均随着温度的降低逐渐增大，呈“S”型上升。

青皮佛手的半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 为  $-4.10$ ，矮化佛手为  $-4.49$  (表 1)。矮化佛手比青皮佛手  $LT_{50}$  低  $0.39$ ，说明矮化佛手抗寒力比青皮佛手强。

表 1 青皮佛手及矮化佛手半致死温度 ( $LT_{50}$ )

Table 1 The sem ilethal temperatures ( $LT_{50}$ ) of Qingpi and Aihua

品种	处理温度 /	拟合方程	拟合度	半致死温度 ( $LT_{50}$ ) /
Cultivar	Treat temperature	Logistic equation	$r_{yx}$	Sem ilethal temperature
青皮 Qingpi	-7 ~ 0	$y = -2.73 + 0.67x$	0.9547	-4.10
矮化 Aihua	-7 ~ 0	$y = -4.85 + 1.08x$	0.9388	-4.49

2.3  $LT_{50}$  处理时间对电解质外渗率的影响

从图 2 看出，在  $LT_{50}$  下，随着处理时间逐渐延长，叶片的电解质外渗率逐渐增加，变化曲线呈“S”型，处理 12 ~ 24 h 时变化显著，青皮佛手由 17.1% 增加到 59.2%，矮化佛手由 16.5% 增加到 44.3%，分别比 12 h 时增加了 3.5 倍和 2.7 倍，表明 12 ~ 24 h 为青皮佛手和矮化佛手  $LT_{50}$  下冷害发生的临界时间。

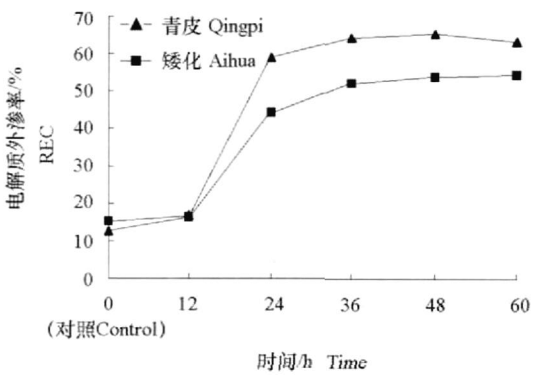


图 2  $LT_{50}$  不同处理时间佛手叶片电解质外渗率变化

Fig 2 Changes in relative electric conductivity of *C. medica* leaves with time of exposure to  $LT_{50}$

## 2.4 $LT_{50}$ 处理时间对 SOD 活性的影响

在  $LT_{50}$ 下, 两个品种的叶片 SOD活性的变化规律基本一致, 呈先上升后下降的趋势, 并在 24 h 时增加到最大值 (图 3)。24 h 时, 青皮佛手的 SOD活性是对照的 3.4 倍, 矮化佛手是对照的 2.1 倍。两个品种的 SOD活性在 24 h 前增加幅度相近; 处理长于 24 h 后, 青皮佛手下降的幅度显著大于矮化佛手。

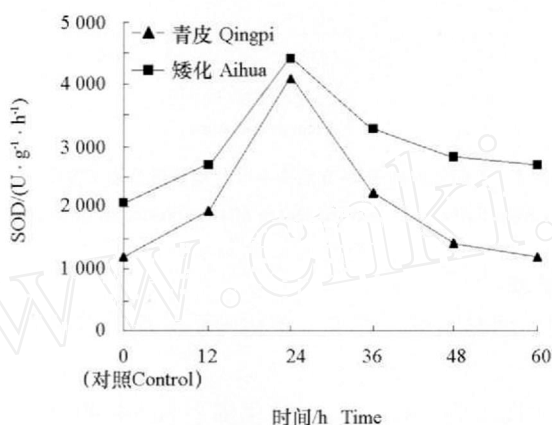


图 3  $LT_{50}$ 下佛手叶片 SOD 活性变化

Fig. 3 Changes in SOD activity in *C. medica* leaves with time of exposure to  $LT_{50}$

## 2.5 $LT_{50}$ 处理时间对 Pro 和 MDA 含量的影响

在  $LT_{50}$ 下, 随着低温胁迫时间的延长, 两个品种叶片的 Pro 含量总体呈上升趋势 (图 4), 0 ~ 12 h 增长缓慢, 但 12 ~ 24 h 急剧增加, 36 ~ 60 h 趋向平缓。60 h 时矮化佛手的 Pro 含量是处理前的 8.2 倍, 青皮佛手是处理前的 8 倍; 矮化佛手的 Pro 含量及其增加幅度均高于青皮佛手。

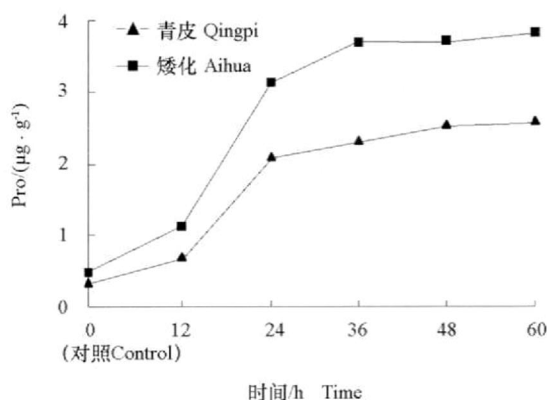
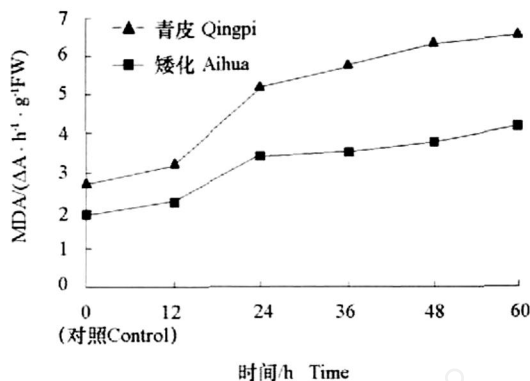


图 4  $LT_{50}$ 下佛手叶片 Pro 含量的变化

Fig. 4 Changes in content of proline in *C. medica* leaves with time of exposure to  $LT_{50}$

佛手的 MDA 含量与 Pro 含量的变化有相同的趋势, 也是随着低温胁迫时间的延长而不断上升 (图 5)。但相反的是在低温胁迫的各个时间, 青皮佛手 MDA 含量及其增加幅度均高于矮化佛手。60 h 时青皮佛手 MDA 含量是低温处理前的 2.4 倍, 而矮化佛手是处理前的 2.2 倍。

图 5  $LT_{50}$ 下佛手叶片 MDA 含量的变化Fig 5 Changes in content of MDA in *C. medica* leaves with time of exposure to  $LT_{50}$ 

### 3 讨论

半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 是评价一个物种抗寒性强弱比较准确的指标 (朱根海 等, 1986; 罗正荣和章文才, 1994; 徐康 等, 2005)。本研究应用此方法计算出青皮、矮化佛手的  $LT_{50}$  分别为  $-4.10$  和  $-4.49$ , 并推算出佛手在  $LT_{50}$  下的冷害发生的临界时间为 12 ~ 24 h。两者的半致死温度虽然相差不大, 但在浙江中部地区冬天实际低温 ( $0 \sim -2$ ) 下, 矮化佛手表现出明显优于青皮佛手的生长势及更强的抗寒性, 深入研究其抗寒机制将有助于解决佛手种植中不耐寒的问题。

当植物受到低温胁迫时, 自由基积累过多, 就会伤害细胞 (Mccord & Fridovich, 1969), 导致膜脂过氧化, SOD 活性降低 (Mead, 1976)。本研究中发现, 在  $LT_{50}$  下, 随着低温胁迫时间的延长, 两个佛手品种叶片 SOD 活性均先上升后下降, 24 h 达到最大值。上升阶段可能是由于低温胁迫处理初期诱导 SOD 活性增加, 有助于清除低温造成的细胞内的自由基积累, 从而保护佛手的细胞膜系统, 提高了佛手的抗寒性, 这是植物本能地对低温进行抵御的机制。但是随着低温胁迫时间的延长, 低温造成的伤害最终打破了体内的代谢平衡, 酶活性不可逆转的下降, 清除自由基的能力下降, 动态平衡失调, 表现出伤害。两个佛手品种 SOD 活性增加幅度相近, 而青皮佛手 SOD 活性下降幅度显著大于矮化佛手, 可以认为青皮佛手对低温胁迫更加敏感。

有研究表明, 植物抗寒性与 Pro 含量成正相关 (Cote et al, 1989), 而与 MDA 含量呈负相关 (刘祖祺和张石诚, 1994)。本研究结果与以往的研究结论吻合, Pro 和 MDA 含量均随着低温胁迫时间的延长不断增加。两个佛手品种相比较而言, 在相同低温处理下矮化佛手叶内积聚的 Pro 要多于青皮佛手, 而 MDA 含量则显著低于青皮佛手, 表明矮化佛手膜脂过氧化程度低于青皮佛手, 具有强于青皮佛手的抗寒力。

本研究中 SOD 活性、Pro 与 MDA 含量的结果以及半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 的结论均表明, 矮化佛手具有强于青皮佛手的抗寒力; 同时, 本研究结果表明从佛手半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 入手, 结合生理生化指标评价佛手抗寒性的方法简便、灵敏、准确性高, 可以作为不同佛手品种抗寒性比较和抗寒品种选育的量化指标。而冷害临界时间的确定为今后研究佛手抗寒性弱的分子机理提供了合适的处理时间。佛手作为我国特有的种质资源, 探讨其寒胁迫生理, 对于今后研究佛手抗寒性弱的分子机理, 寻找提高佛手耐寒性的新途径, 扩大佛手栽培适应区域和进一步开发利用这一植物资源都具有重要作用。

### References

Cote B, Vogel C S, Dawson O. 1989. Autumnal changes in tissue nitrogen of autumn olive, black alder and eastern cottonwood. *Plant Soil*, 188:

23 - 32

Chen Bing-chu, Shentu Wen-yue. 2003. Compared on biological characteristics in 3 types of Jinhua fingered citron. *Forest Research*, 16 (6): 774 - 776. (in Chinese)

陈秉初, 申屠文月. 2003. 3个金华佛手类型主要生物学特性的比较研究. *林业科学研究*, 16 (6): 774 - 776.

Giannopolitis C N, Ries S K. 1977. Superoxide dismutases: I Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 59: 309 - 314.

Guo Wei-dong, Lu Mei, Zhou Chun-li, Fan Lin-li, Pan Yi-feng. 2006. Effect of  $^{137}\text{CS-}$  radiation to *Citrus medica*. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, (1): 31 - 33. (in Chinese)

郭卫东, 路梅, 周春丽, 范琳丽, 潘一峰. 2006. 佛手  $^{137}\text{CS-}$  射线辐射效应研究. *浙江农业科学*, (1): 31 - 33.

Luo Zheng-rong, Zhang Wen-cai. 1994. Determination on cold hardness of application of Logistic equation. *Journal of Fruit Science*, 11 (2): 100 - 102. (in Chinese)

罗正荣, 章文才. 1994. 应用 Logistic 方程测定柑桔抗冻力的探讨. *果树科学*, 11 (2): 100 - 102.

Liu Zu-qi, Zhang Lian-hua, Zhu Pei-ren. 1990. Change of free and conjugated abscisic acids detected by radioimmunoassay during accumulation and deacclimation of *Citrus unshiu* Marc. *Acta Horticulturae Sinica*, 17 (3): 197 - 202. (in Chinese)

刘祖祺, 张连华, 朱培仁. 1990. 用放射免疫法分析柑桔抗寒锻炼中游离和结合态脱落酸的变化. *园艺学报*, 17 (3): 197 - 202.

Liu Zu-qi, Zhang Shi-cheng. 1994. *Plant physiology of resistance*. Beijing: China Agriculture Press: 8 - 29. (in Chinese)

刘祖祺, 张石诚. 1994. *植物抗性生理学*. 北京: 中国农业出版社: 8 - 29.

Mccord J M, Fridovich J. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (Hemocaprein). *Journal of Biological Chemistry*, 224: 6049 - 6055.

Mead J F. 1976. Free radical mechanism of lipid damage, a consequence for cellular membranes//Przyor W A. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press: 185 - 210.

Xiao Lang-tao, Wang San-gen. 2005. *Plant physiology experiment technology*. Beijing: China Agriculture Press: 152 - 153. (in Chinese)

萧浪涛, 王三根. 2005. *植物生理学试验技术*. 北京: 中国农业出版社: 152 - 153.

Xu Kang, Xia Yi-ping, Xu Bi-yu, Lin Tian, Yang Xia. 2005. Measurement of cold tolerance based on REC and the Logistic equation in *Camellia hianalis* 'Shishi Gashira'. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (1): 148 - 150. (in Chinese)

徐康, 夏宜平, 徐碧玉, 林田, 杨霞. 2005. 以电导法配合 Logistic 方程确定茶梅 '小玫瑰' 的抗寒性. *园艺学报*, 32 (1): 148 - 150.

Zhang Zhi-liang. 1990. *Plant physiology experiment direction*. Beijing: Higher Education Press: 268 - 271. (in Chinese)

张志良. 1990. *植物生理学实验指导*. 北京: 高等教育出版社: 268 - 271.

Zhou Chun-li, Guo Wei-dong. 2005. The research advance of gemplass resources on *Citrus medica*. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, (3): 89 - 92. (in Chinese)

周春丽, 郭卫东. 2005. 佛手种质资源研究进展. *陕西农业科学*, (3): 89 - 92.

Zhu Gen-hai, Liu Zu-qi, Zhu Pei-ren. 1986. A study on determination of lethal temperature with logistic function. *Journal of Nanjing Agricultural University*, (3): 11 - 16. (in Chinese)

朱根海, 刘祖祺, 朱培仁. 1986. 应用 Logistic 方程确定植物组织低温半致死温度研究. *南京农业大学学报*, (3): 11 - 16.

## 图书推荐

## 《果品品质研究》

《果品品质研究》由关军锋主编, 是根据我国果品生产发展方向和在果品品质研究日益受到重视的前提下编写的。全书共分五篇, 第一篇系统介绍果品品质的概念、风味物质及绿色果品的生产; 第二篇着重阐述了采前果实品质的发育机理及影响因素, 如生态、水分、激素的调控及果实品质的遗传和改良; 第三篇总结了减少采后果实品质损失的策略及途径, 介绍了重要氧化酶的理化性质; 第四篇分析了主要果实生理病害的发生机理和控制途径; 第五篇介绍了果实品质的数学评价方法和常见果品品质的测定技术。定价: 30 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。