

我国几个不同地域长梗扁桃苗木的抗寒性研究

郭改改¹, 魏 钰¹, 封 斌², 麻保林², 张应龙³, 郭春会^{1*}

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省治沙研究所, 陕西 榆林 719000;
3. 神木县生态协会, 陕西 神木 719300)

摘 要: 分别取自河北、固阳、神木、榆林、乌审旗 5 地生长状况基本相同的长梗扁桃 1 年生休眠枝条为材料, 通过人工冷冻模拟外界环境, 对长梗扁桃枝条进行 -15°C 、 -19°C 、 -23°C 、 -27°C 、 -31°C 、 -35°C 、 -39°C 等 7 个温度梯度处理。测得这些休眠枝条的相对电导率、SOD、POD 活性、游离脯氨酸含量及 MDA 含量, 并对低温处理过的部分枝条进行恢复生长来测定其萌芽率, 最后对测定结果进行分析和比较。结果表明: 5 个地区的长梗扁桃的相对电导率、SOD、POD 活性、游离脯氨酸含量及 MDA 含量均随着处理温度的降低而呈现上升趋势, 并且抗寒性强的地区的长梗扁桃 SOD、POD 活性和游离脯氨酸含量相对较高, MDA 含量和电导率较低, 恢复生长枝条的萌芽率均比同温度处理下的抗寒性弱的高。抗寒性强弱顺序为: 河北(H) > 乌审旗(W) > 固阳(G) > 神木(S) > 榆林(Y), 河北和乌审旗的长梗扁桃抗寒性较强, 可以对其进行广泛的品种选育和推广。

关键词: 长梗扁桃; 抗寒性; 相对电导率; 保护酶系统; 脯氨酸; 丙二醛; 恢复萌芽率

中图分类号: S662.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2013)04-0011-05

Cold-resistance of *Amygdalus pedunculata* from Different Provenances in China

GUO Gai-gai¹, WEI Yu¹, FENG Bin², MA Bao-lin², ZHANG Ying-long³, GUO Chun-hui^{1*}

(1. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Shaanxi Institute of Sand Control, Yulin, Shaanxi 719000, China; 3. Shenmu Ecological Association, Shenmu, Shaanxi 719300, China)

Abstract: The annual dormant *Amygdalus pedunculata* branches were collected from five different provenances (Hebei, Guyang, Shenmu, Yulin, and Wushenqi) in China to examine their cold resistance. The branches were treated under 7 artificial simulated low temperatures: -15°C , -19°C , -23°C , -27°C , -31°C , -35°C , and -39°C . Relative parameters of the branches subject to cold treatment were measured, including the relative leakage of electrolytes, super oxide dismutase (SOD) activity, peroxidase (POD) activity, the contents of proline and malondialdehyde (MDA). The recovery rates of germination of the treated branches were examined and compared. The values of the parameters all increased with the decrease of temperature. The species with excellent cold resistance had higher contents of proline, higher activity of SOD and POD, but lower MDA and relative leakage of electrolytes. After the recovery from low temperature, the species with excellent cold resistance had a significantly higher germinating rate than the other species. The sequence of cold resistance was in the order of Hebei(H) > Wushenqi(W) > Guyang(G) > Shenmu(S) > Yulin(Y). Both Hebei and Wushenqi showed excellent cold resistance, and can be widely introduced and extended.

Key words: *Amygdalus pedunculata*; cold-resistance; relative leakage of electrolyte; protective system; proline; MDA; recovery rate of germination

收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2012-12-02

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(201104074); 西北农林科技大学唐仲英育种专项。

作者简介: 郭改改, 女, 硕士研究生, 研究方向: 果树生理。E-mail: 273054548@qq.com

* 通信作者: 郭春会, 女, 教授, 研究方向: 果树栽培及生物技术。E-mail: 906832715@qq.com

长梗扁桃(*Amygdalus pedunculata*),俗称“野樱桃”,属蔷薇科扁桃属落叶灌木,曾经广泛分布于甘肃、内蒙古、陕北等地区^[1]。目前河北、内蒙古和榆林均发现野生群落。从长梗扁桃自然生长的生态条件看,长梗扁桃性的适应性极强,在地处寒冷干旱的毛乌素沙漠及石砾山区均可以生存。采集当地的长梗扁桃的种子,成苗率,发芽率和造林成活率在80%以上,具有非常强的抗旱抗寒性,耐贫瘠,抗风沙和虫害的侵袭能力,其最高树龄可达200 a多,防沙治沙、水土保持、生态环境建设的优势树种。据分析长梗扁桃的仁中含有人体所需的9种微量元素,属于高K,高Ca,富Fe,富Zn,含优质蛋白,不含Pb、Cd、Hg、As有害元素的健康食品。同时,氨基酸种类齐全,含量丰富具有重要的开发价值^[2]。

本研究以分布于内蒙古、河北、榆林等5个不同地区的长梗扁桃枝条为试材,拟通过对其枝条电导

率及生理生化指标的测定,明确生长环境与长梗扁桃抗寒性的关联,探索其抗寒机理,评定其抗寒能力,筛选出5个地区中抗寒性最强的长梗扁桃,对下一步的品种选育以及产业发展具有重要意义,同时也为寻找长梗扁桃抗寒性材料和培育抗寒性强的新产品提供理论依据。从而在产量和质量上突破长梗扁桃在我国的发展现状,进一步实现长梗扁桃在防护林和经济林中的价值作用。

1 材料与方法

1.1 材料

于2011年12月分别采自河北、固阳、神木、榆林、乌审旗5个地方,选取生长状况基本相同的1年生健壮枝条,尽可能保证枝条处于休眠状态,充分成熟、整齐均匀、粗度相近,然后将其组成混合样,用保鲜袋包好带回实验室(表1)。

表 1 供试材料所在地和产地特征

Table 1 Locations and habitat characters of experimental materials

品种来源	所在 地区	海拔高度 /m	经度(E)	纬度(N)	年平均 温度/℃	年降水量 /mm	产地
河北(H)	河北	600~1 000	115°55′~117°23′	40°54′~42°01′	6.1	503	丰宁县东卯乡
乌审旗(W)	内蒙古	1 000~2 400	108°~109°03′	38°~39°	6.7	300~400	乌审旗
固阳(G)	包头市	1 000	110°03′	41°03′	4.0	300	固阳县新建乡
神木(S)	神木县	1 200~1 300	107°20′~111°30′	37°27.5′~39°22.5′	8.5	250.0~440.8	锦界镇
榆林(Y)	榆阳区	1 200~1 300	108°58′~110°24′	37°49′~38°58′	8.1	406.9	补浪河镇

1.2 试验处理

将采集回来的供试长梗扁桃枝条先后用自来水冲洗和去离子水冲洗多次,然后从枝条的第4芽开始将其剪成20 cm长的短枝,最后用洁净的纱布擦干,将末端蜡封,用保鲜袋分装备用。每个样本分为9份,每份包括12段枝条,用干净纱布包好放入塑料袋中,置于-5℃的超低温冰箱中进行人工冷冻处理。12 h后按品种各取1份,再以4℃·h⁻¹的速率降温,到达设定温度后保持12 h。取出一批枝条后再继续降温,直到-39℃时为止。处理完毕的枝条在0℃下静置8 h后,然后以同样的速率缓慢升至室温,并于室温下将解冻后的枝条放置12 h后用于指标测定。以4℃下保存为对照,每处理均重复3次,每个重复包括12段枝条,共设-15℃,-19℃,-23℃,-27℃,-31℃,-35℃,-39℃等7个温度梯度处理。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 相对电导率 将处理后的枝条用无离子水冲洗干净,避开芽眼,剪成0.2 cm的小段,混合均匀,称取2 g放入25 mL具刻度试管中,加20 mL去离子水,抽气40 min,摇匀后,用EC-215型电导仪测初电导率,封口后于沸水中煮1 h,冷却至室

温,静置5 h,测定终电导率。每处理重复3次。相对电导率^[3]:

$$\text{相对电导率} = (\text{初电导率} / \text{终电导率}) \times 100\%$$

利用相对电导率并配以Logistic方程,参照徐海霞^[3]等计算各品种的半致死温度(LT₅₀)。

1.3.2 SOD、POD活性、游离脯氨酸含量及MDA含量 取长梗扁桃枝条,用去离子水冲洗干净,避开芽眼,剪成3~5 mm的小段,混合均匀称取0.5 g,充分研磨致碎,每品种重复3次。放入冰浴的研钵中,先加入0.05 mol·L⁻¹(pH=7.8)磷酸缓冲液2 mL,并加入少量石英砂充分研磨至匀浆,转至10 mL容量瓶中,用缓冲液冲洗研钵2~3次(每次1~2 mL),定容,摇匀后放入冷冻离心机,4℃下10 000 r高速离心15 min,抽取上清液于离心管,置于冰箱保存备用,上清液为用于测定过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和可溶性蛋白的粗提液。可溶性蛋白采用考马斯亮蓝法,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性采用孙群^[4]等的方法测定,游离脯氨酸含量用茚三酮法测定^[5],丙二醛(MDA)含量用硫代巴比妥酸(TBA)法测定^[4]。

1.3.3 恢复生长后枝条的萌芽率 将低温处理后

每个试验枝条,选取其中的 1 个重复,在室温下进行水培,并观察所有芽的萌发情况^[6]。

2 结果与分析

2.1 低温处理对各品种长梗扁桃枝条相对电导率的影响

果树在受到冻害时,细胞的质膜透性会增大,导致电解质的外渗,并且抗寒性强的植物细胞膜透性变化幅度小,而抗性较弱的细胞膜透性变化幅度较大^[7]。所以在果树的抗寒性研究中,测定外渗相对电导率是首选方法之一^[8-9]。通过图 1 可以看出,长梗扁桃的 1 年生休眠枝条在低温处理后的,相对电导率与温度变化呈负相关性,是随着温度的不断降低,相对电导率呈现出一种上升的趋势;且相对电导率与梯度低温处理间呈现着“S”型曲线的关系。当温度高于-19℃时,各地区长梗扁桃的相对电导率上升开始变得缓慢。当温度逐渐下降至-27℃以下时,其相对电导率迅速增加,-27℃时乌审旗(W)、神木(S)、河北(H)、榆林(Y)、固阳(G)等地的长梗扁桃相对电导率分别为 64.49%、66.94%、61.62%、71.14%和 65.93%;此时它们的相对电导率与起始温度的相对电导率相比增幅分别为 30.63%、21.90%、31.48%、33.64%和 21.67%。

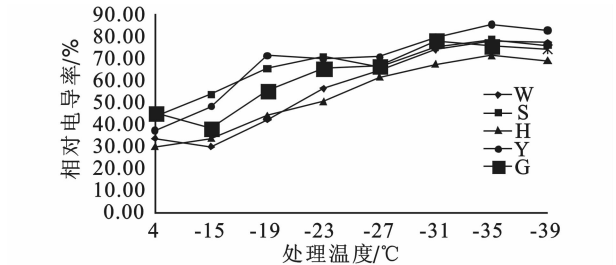


图 1 低温处理对长梗扁桃枝条相对电导率的影响
Fig.1 Effect of low temperature treatment on the relative electric conductivity of *A. pedunculata* branches

其中固阳(G)地区的增幅最小,榆林(Y)地区的增幅最大。当温度下降至-31℃时,各地区长梗扁桃的相对电导率上升开始变得缓慢,最后接近不变。将各处理温度下长梗扁桃枝条的相对电导率用 Logistic 方程拟合,求得乌审旗(W)、神木(S)、河北(H)、榆林(Y)、固阳(G)地区的长梗扁桃的低温半致死温度(LT₅₀)分别为-36.60℃、-31.29℃、-36.85℃、-31.17℃、-35.19℃。

总的来说 5 个地区的长梗扁桃的枝条在梯度低温处理下,相对电导率由大到小依次表现为:榆林(Y)>神木(S)>固阳(G)>乌审旗(W)>河北(H),其中河北地区的扁桃的相对电导率最小,说明其枝条细胞膜被冷冻破坏的程度较低,而榆林地区长梗扁桃枝条的相对电导率最大,细胞膜被破坏程度较高。且所得的半致死温度大小的顺序为:榆林(Y)>神木(S)>固阳(G)>乌审旗(W)>河北(H)。

2.2 抗寒性与长梗扁桃枝条萌发的相互关系

植物在遭受低温胁迫后,评价其的受冻害程度和能否存活的最直观方法是枝条能否恢复发芽。苏向荣^[6]等在对李属砧木低温胁迫测定中也用到此法,并证实了可行性。因此用人工低温处理过的扁桃枝条恢复萌发状况来鉴定品种的抗寒性是可行的。如表 2 所示,在对照温度(4℃)下,各枝条的萌芽率均在 90.50%以上,随着温度的下降萌芽率下降明显。-15℃~-23℃时,各品种的萌芽率下降相对比较缓慢,且河北(H)和乌审旗(W)地区的萌芽率比他地区的较高;在-27℃时,各枝条的萌芽率均下降急剧,在-31℃~-35℃时,河北(H)和乌审旗(W)地区的枝条萌芽率低于 10%,而其他 3 个地区的均不再萌芽,其中榆林(Y)地区的长梗扁桃枝条在-27℃时便不能再萌芽。可见,5 个地区的长梗扁桃萌芽率的表现为河北(H)>乌审旗(W)>固阳(G)>神木(S)>榆林(Y)。

表 2 不同低温处理下休眠长梗扁桃枝条恢复生长后萌芽率		Table 2 Effect of different low temperature treatments on germinating rate of <i>A. pedunculata</i> branches							%
品种来源	温度/℃								
	-15	-19	-23	-27	-31	-35	-35		
河北(H)	93.40	88.37	66.72	42.15	12.68	6.31	3.22		0
乌审旗(W)	90.50	83.12	60.01	38.42	9.29	5.54	1.19		0
固阳(G)	92.80	79.48	53.19	23.55	1.80	0.00	0.00		0
神木(S)	93.00	72.31	42.98	10.67	0.82	0.00	0.00		0
榆林(Y)	92.90	72.26	39.79	9.23	0.00	0.00	0.00		0

2.3 抗寒性对长梗扁桃枝条中 SOD 活性的影响

植物体内存在的过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)具有消除活性氧及自由基的毒害作用,使细胞膜处于稳定状态^[10]。从图 2 可以看出,扁桃枝条的 SOD 活性均随着处理温度的降低而表

现出先升后降的趋势。在-35℃时均达到峰值,之后均迅速下降。5 个地区的长梗扁桃中,SOD 活性峰值最高的为河北(H)地区的,接近 150 U·(g·min),最低的为榆林(Y)地区的长梗扁桃,约为 75 U·(g·min)。各长梗扁桃 SOD 活性的变化与相

对电导率的基本一致(图 1),5 个地区长梗扁桃的抗寒性强弱顺序表现为河北(H)>乌审旗(W)>固阳(G)>神木(S)>榆林(Y)。

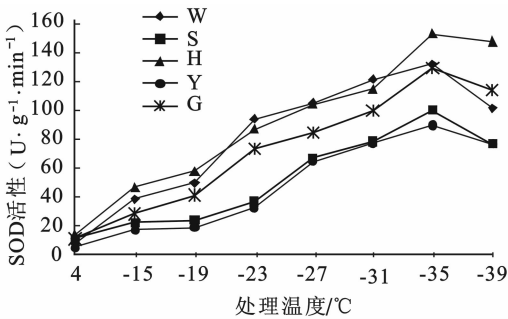


图 2 低温处理对扁桃枝条 SOD 活性的影响
Fig.2 Effect of low temperature treatments on the SOD activity of *A. pedunculatu* branches

2.4 低温处理对扁桃枝条 POD 活性的影响

由图 3 显示,在低温梯度的处理下,不同种源长梗扁桃枝条内 POD 酶活性的变化趋势与 SOD 一致;在-15℃~-19℃时出现 POD 活性急剧上升,之后呈现缓慢上升,直到-35℃时达到峰值,超过-35℃时就开始下降。与起始温度相比,-39℃时,5 个种源的长梗扁桃的 POD 活性分别是起始温度的 2~3 倍。在 5 种供试的长梗扁桃中,POD 活性的大小顺序依次为河北(H)>乌审旗(W)>固阳(G)>神木(S)>榆林(Y)地区的扁桃。

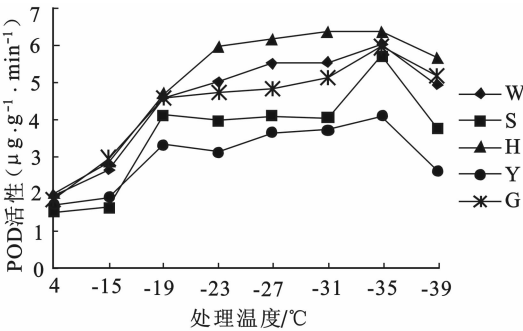


图 3 低温处理对扁桃枝条 POD 活性的影响
Fig.3 Effect of different low temperature treatments on the POD activity of *A. pedunculatu* branches

2.5 低温处理对扁桃枝条 MDA 含量的影响

植物在逆境胁迫时,组织细胞内会产生大量的自由基,并诱发或加剧细胞膜脂过氧化,从而导致细胞膜破坏。丙二醛作为膜脂过氧化的最终产物,是反映细胞膜伤害程度的一个重要指标^[11]。图 4 显示 5 个供试长梗扁桃枝条的 MDA 含量均随着处理温度的降低表现出一定的增加趋势,在-15℃时,与起始 4℃下的 MDA 含量相比,河北(H)地区长梗扁桃的增幅最为明显,神木(S)和榆林(Y)地区的长梗扁桃相对来说 MDA 含量增加幅度较小。到了-29~-35℃的过程中,各个地域的长梗扁桃

MDA 含量均成迅猛上升的趋势,并在-35℃时达到峰值,各峰值从高到低的顺序一次为榆林(Y)>神木(S)>固阳(G)>乌审旗(W)>河北(H),可以看出供试 5 个地区的长梗扁桃中抗寒性最强的为河北(H)地区,抗寒性最弱的是榆林地区的长梗扁桃。

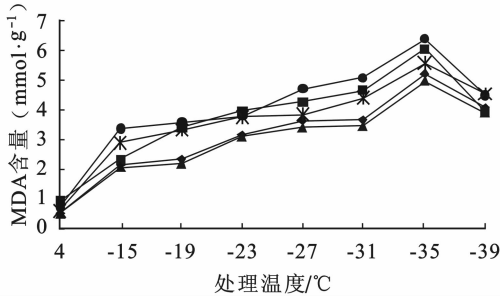


图 4 低温处理对扁桃枝条丙二醛(MDA)含量的影响

Fig.4 Effect of low temperature treatments on the MDA contents of *A. pedunculatu* branches

2.6 低温处理对扁桃枝条游离脯氨酸含量的影响

已有研究证实无论是抗寒性强的植物,还是抗寒性较弱的植物,其植物体中脯氨酸的含量均随温度的下降而上升。因此,脯氨酸是植物在低温胁迫时重要的保护物质,其含量的增加有助于提高植物的抗寒性^[12]。

图 5 可以看出,随着处理温度的降低,尤其是在-15~-27℃的过程中,各地区长梗扁桃的脯氨酸含量均呈现上升趋势,但上升的幅度存在着差异。其中,河北(H)地区的长梗扁桃中游离脯氨酸的含量要明显高于其他地区的,其次是固阳(G)地区的,而神木(S)、乌审旗(W)和榆林(Y)3 个地域的扁桃在此时相差不大;另外,5 个地区的长梗扁桃都会在一23℃时有小幅度的凹陷,可能是因为实验材料的贮藏原因,也可能是因为其他有待发现的影响植物游离脯氨酸含量的因素;温度低于-27℃后,随着温度的下降,5 个地域长梗扁桃的游离脯氨酸含量均下降明显,这与植物在重度胁迫时的耐受性有关。

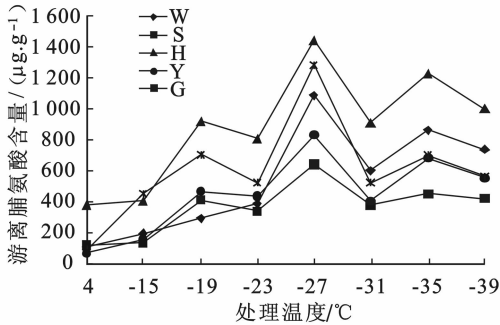


图 5 低温处理对扁桃枝条游离脯氨酸含量的影响
Fig.5 Effect of low temperature treatments on the proline contents of *A. pedunculatu* branches

总体上,游离脯氨酸的含量随着温度的降低呈现出一种缓慢升高中的上下波动,其中在 $-23\sim-27^{\circ}\text{C}$ 这一温度段中有着剧烈的波动值。此外,根据现今的研究现状,在超出一定低温阈值时的脯氨酸含量与植物对低温的耐变性的关系和作用机理还有待进一步的研究。

3 结论与讨论

植物的细胞膜不仅是细胞与外界环境发生物质交换的主要通道,也是在接受胁迫时感受刺激最敏感的原生质体组成成分。当植物受到胁迫时,一般表现为细胞原生质膜透性增大,离子外渗,相对电导率增大^[13-15]。同时,在胁迫时由于活性氧的代谢平衡也受到破坏,自由基和活性氧的增加对作物起到了伤害作用,而防御体系,即内源性保护性酶、抗氧化酶,如 POD 和 SOD 酶等会及时增加,清除植物体内过量的活性氧和自由基使植株免受或少受伤害,因此它们是植物重要的耐冷保护酶系统,从而保证植物正常的生理机体^[16-17]。本试验中,随处理温度的降低 POD 和 SOD 酶呈先升后降的变化趋势,说明在超过某一低温逆境条件下,会造成植物组织内细胞膜损伤,从而使与防御活性氧有关的酶促和非酶促保护系统的能力直接降低了,并使得植物体内产生过多的自由基,诱发了脂质过氧化作用,MDA 大量积累,膜系受损,导致植物冻害发生^[18-20]。在许多植物领域也证实了脯氨酸是重要的抗寒保护性物质,它可以提高渗透压,增强保水力,从而提高植物抗冷性^[11],这与本试验的测定结果也相一致。对不同低温处理的枝条进行了恢复生长试验,结果同上。固阳、神木、榆林地区的长梗扁桃在 -31°C 时电导率还在上升,而枝条萌芽率在 -31°C 时无一萌芽,这与侯元凯^[21]等在兰考泡桐苗木顶芽耐寒性研究中得出被低温处理过的枝条死亡顺序是顶芽>侧芽和枝条比较吻合,也与本试验其他测定指标得出的结论相一致。但是评价植物的抗逆性不能仅仅从某一方面得出结论,还应结合其所在地或者原产地的气候及地理位置等影响因子。结合各品种所在地的纬度由高到低的顺序与实验中测定的抗寒性强弱的顺序基本一致,而与所在地的海拔,经度,年平均温度和年平均降雨量没有明显的相关性,但各因子在综合性能上有着或多或少的影响力。

通过测定低温胁迫过的长梗扁桃枝条的电导率,保护酶系统 POD 和 SOD 的酶活性,MDA,脯氨酸含量,以及胁迫过的枝条的萌芽状况各指标进行分析,并考虑到各品种所在地的气候与地理位置的影响,可得出供试材料的抗寒性顺序为河北(H)>

乌审旗(W)>固阳(G)>神木(S)>榆林(Y),其中乌审旗(W)与固阳(G)地区之间,神木(S)与榆林(Y)地区之间的抗寒性差距不是很明显。综合分析表明,各地区的长梗扁桃均具有较强的抗寒性,河北和乌审旗地区的长梗扁桃应扩大其栽培区域。同时,试验还为长梗扁桃抗寒性在分子生物学的研究方面提供了抗寒资料和理论基础,也为地区间引种提供参考,并为进一步的长梗扁桃品种选育提供了理论依据。

参考文献:

[1] 张檀,郑瑞杰,梅立新,等.长梗扁桃种子萌发特性的研究[J].西北林学院学报,2006,21(4):73-76.
ZHANG T,ZHENG R J,MEI L X,*et al.* Germination characters of the seeds of the *Amygdalus pedunculata* Pall[J]. Journal of Northwest Forestry University,2006,21(4):73-76. (in Chinese)

[2] 王燕,魏蔚,董发昕,等.长梗扁桃仁的营养成分分析[J].西北大学学报:自然科学版,2009,39(1):59-62
WANG Y,WEI W,DONG F X,*et al.* Analysis of nutrients in amygdalus[J]. Journal of Northwest University : Natural-Science Edition,2009,39(1):59-62. (in Chinese)

[3] 徐海霞,任红松,袁继勇.用 EXCEL 及其规划求解功能拟合曲线方程[J].农业网络信息,2004(2):37-39.

[4] 孙群,胡景江.植物生理学研究技术[M].杨陵:西北农林科技大学出版社,2005:165-169.

[5] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司西安分公司,2000:201-202.

[6] 苏向辉,秦伟,刘立强,等.低温胁迫对李属 4 种砧木几个抗寒指标的影响[J].新疆农业大学学报,2012,35(2):112-115.
SU X H,QIN W,LIU L Q,*et al.* Effects of low temperature stress on some cold resistance indexes of four kinds of root stock *Prunus*[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2012,35(2):112-115. (in Chinese)

[7] 李晶,王福森,李树森,等.几个杨树新品系抗寒性测定试验[J].防护林科技,2012,106(1):59-61.
LI J,WANG F S,LI S S,*et al.* Cold-resistance determination for several new strains of *Poplar*[J]. Protection Forest Science and Technology,2012,106(1):59-61. (in Chinese)

[8] 魏钰,郭春会,张国庆,等.我国几个扁桃种抗寒性的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(6):99-106.
WEI Y,GUO C H,ZHANG G Q,*et al.* ,Studies on cold-resistance of several Chinese species of almond[J]. Journal of Northwest A&F University:Natural Science Edition,2012,40(6):99-106. (in Chinese)

[9] 王文举,张亚红,牛锦凤,等.电导法测定鲜食葡萄的抗寒性[J].果树学报,2007,24(1):34-37.
WANG W J,ZHANG Y H,NIU J F,*et al.* Study on cold tolerance of table grape cultivars by measuring the conductivity[J]. Journal of Fruit Science,2007,24(1):34-37. (in Chinese)

[10] ALBERT H M. Chilling injury: a review of possible causes [J]. Hort Science,1986,21(6):1329-1333.