

不同保存方法对秋石斛叶片抗寒生理指标的影响

何嘉琦^{1,2}, 张东雪¹, 尹俊梅¹, 陆顺教¹

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737 2; 2. 海南大学 园艺园林学院, 海南 海口 570228)

摘要:为探讨样品的保存对其生理指标测定的影响,以秋石斛 088 叶片为材料,分别测定叶片和提取液在 4、-20、-70 ℃ 条件下保存 1、2、3 d 时的可溶性蛋白、叶绿素、MDA(丙二醛)及 FPro(游离脯氨酸)等 4 个生理指标的变化情况,研究不同生理指标测定适合的样品保存条件和时间。结果表明:叶片样品中可溶性蛋白含量随着保存时间的延长而逐渐下降,其中-70 ℃ 保存 1 d 时含量与鲜叶相近;叶绿素含量则随着保存时间的延长呈现先上升后下降然后趋于稳定,各温度条件下叶片和提取液的叶绿素含量均在保存 2 d 后与对鲜叶相近;MDA 的含量在不同温度及时间保存处理间存在轻微的波动,但差异不显著;FPro 的含量在不同温度下均随保存时间的延长均呈现骤然上升然后下降并趋于稳定,其中以提取液-20 ℃ 保存 2 d 时与鲜叶最为接近。

关键词:秋石斛叶片;温度;生理指标

中图分类号:S567.239 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)09-0072-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0072

秋石斛(*Dendrobium* spp.)是重要的观赏兰花,具有开花时间长、花姿优雅、花多、枝长等特点,是石斛兰(*Dendrobium Swartz*)中最具观赏价值的种群,也是重要的观赏切花和盆花,在兰花的商业生产中具有十分重要的地位和十分广阔的发展前景^[1-3]。近年来,由于秋石斛产业的快速发展,科研工作者开始在栽培生理、开花生理、逆境生理以及采后生理等方面对秋石斛展开大量研究。而生理指标的测定是植物生理学的重要手段,是研究植物生长发育、逆境胁迫、代谢调控等生理机制的重要基础。植物材料是提取植物生理调节物质的物质基础,一般情况下均采用新鲜材料提取活性目标物质。但有时候研究涉及大量的材料处理,无法对新鲜材料即刻提取、测定相关生理指标物质,样品的保存成为实验研究的关键步骤。样品保存的质量,将直接影响到生理调节物质的提取,进而影响到实验研究的准确性。样品保存不当将导致内源物质的降解或者变性,给生理指标的测定带来很大的影响。但目前尚未有关于样品保存方法对植物生理指标测定影响的相关报道,本研究以秋石斛叶片为材料,分析了不同

保存温度及时间对叶片及提取液可溶性蛋白、叶绿素、MDA(丙二醛)及 FPro(游离脯氨酸)含量的影响,筛选出针对不同生理指标的适合样品保存方法,以期为今后的秋石斛生理学研究提供参考,同时为其它植物的生理学研究样品保存提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料秋石斛 088 来自中国热带科学研究院热带作物品种资源研究所热带花卉中心兰花种质资源圃,株高均在 10~15 cm,长出第 3 片叶,植株的顶端叶片为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验于 2015 年在中国热带农业科学院试验室进行。材料从苗圃采回后,将保存方式分为叶片离体保存及提取液保存。经各个温度处理不同时间后,将叶片及各指标的提取液取出进行各个生理指标的测定。①叶片鲜样在 4 ℃ 下处理 1、2、3 d;②叶片鲜样在-20 ℃ 下处理 1、2、3 d;③叶片鲜样在-70 ℃ 下处理 1、2、3 d;④叶片提取液在 4 ℃ 下处理 1、2、3 d;⑤叶片提取液-20 ℃ 下处理 1、2、3 d;⑥叶片提取液-70 ℃ 下处理 1、2、3 d;未经保存处理的鲜叶为对照。

1.2.2 测定项目及方法 可溶性蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法;FPro 含量的测定采用茚基水杨酸比色法,MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸比色法,叶绿素含量的测定采用 95%乙醇浸

收稿日期:2016-06-12

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(1630032014014);海南省自然科学基金面上资助项目(20163131)

第一作者简介:何嘉琦(1992-),女,海南省海口市人,在读硕士,从事植物抗逆生理研究。E-mail:hjqzmjcc@163.com。

通讯作者:陆顺教(1981-),男,博士,助理研究员,从事生物技术及分子生物学研究。E-mail:lushunjiao@sina.com。

提法,可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法^[4]。各项指标测定时重复 3 次,每个重复测定 3 次吸光度值,取平均值。

1.2.3 数据处理方法 试验数据采用 Excel 2013 和 SPSS Statistics17.0 处理和统计分析。所有数据分析均采用单因素分析。

2 结果与分析

2.1 不同保存方式对可溶性蛋白含量的影响

由图 1 可看出,同一温度条件下,随着保存时间的延长,可溶性蛋白含量呈现下降趋势。相同保存时间条件下,可溶性蛋白含量随着保存温度

的上升呈现逐渐下降。同时,在同一保存温度和保存时间条件下,叶片保存比提取液保存的样品可溶性蛋白含量稍高。差异显著性分析结果显示,在相同保存温度和保存时间下,叶片保存的可溶性蛋白含量和提取液保存差异不显著。4℃条件下,随着保存时间的延长,其叶片和提取液的可溶性蛋白含量均呈现显著下降;与对照相比,样品在-20℃下保存 1 d 时无显著差异,保存 2、3 d,其结果与对照差异显著;与对照相比,样品在-70℃下保存 1 d 及 2 d 时无显著差异,保存 3 d 时则有显著差异。

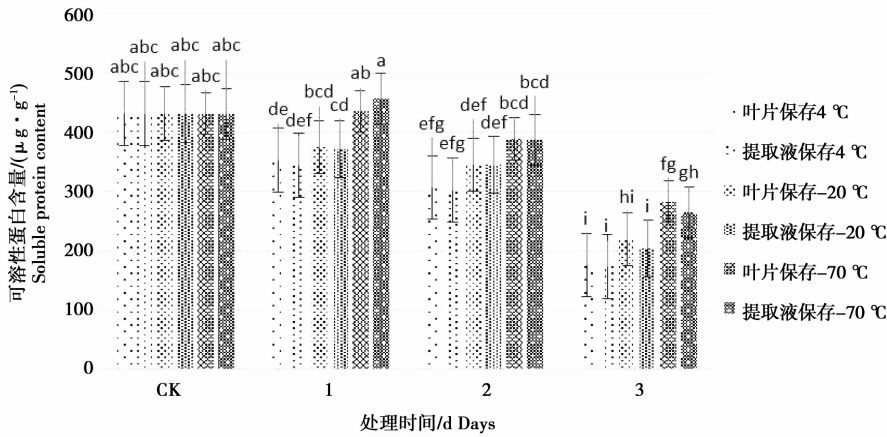


图 1 不同处理下可溶性蛋白的含量变化

Fig. 1 The change of soluble protein content under different treatments

2.2 不同保存方式对秋石斛叶片叶绿素含量的影响

由图 2 可看出,相同的保存温度条件下,随着保存时间的延长,叶片样品中总叶绿素含量呈现出先上升后下降然后趋于稳定的趋势。而在相同

保存时间条件下,总叶绿素含量在不同温度处理之间差异显著。显著性分析结果显示,相同保存温度及保存时间下,叶片保存和提取液的总叶绿素含量差异不显著;相同温度及相同保存方式下,不同保存时间之间差异不显著。

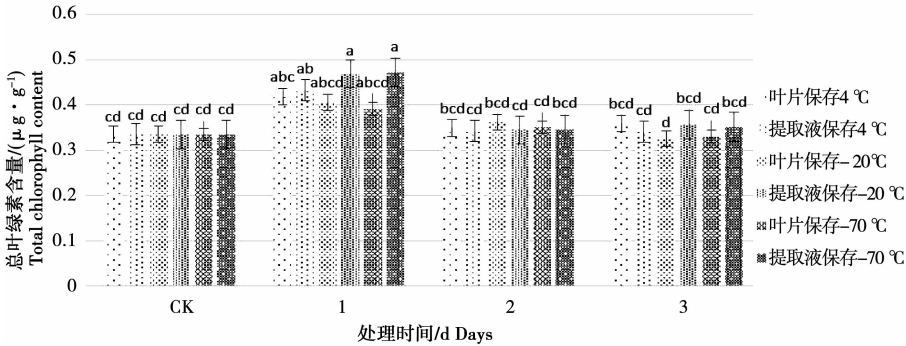


图 2 不同处理下总叶绿素的含量变化

Fig. 2 The change of total chlorophyll content under different treatments

2.3 不同保存方式对秋石斛叶片 MDA 含量的影响

从图 3 可看出,相同保存温度条件下,随时间

的延长,MDA 含量变化不大。相同保存时间条件下,随着保存温度的降低,提取液保存的 MDA 含量呈现出降低趋势,而叶片保存则出现微弱波

动。显著性分析显示,4℃下保存 1、2、3 d 及 -20℃下保存 2 d,叶片保存与提取液保存的 MDA 含量差异显著,其它条件下 2 种保存方式

之间差异不显著。相同温度下,不同保存时间之间差异不显著。

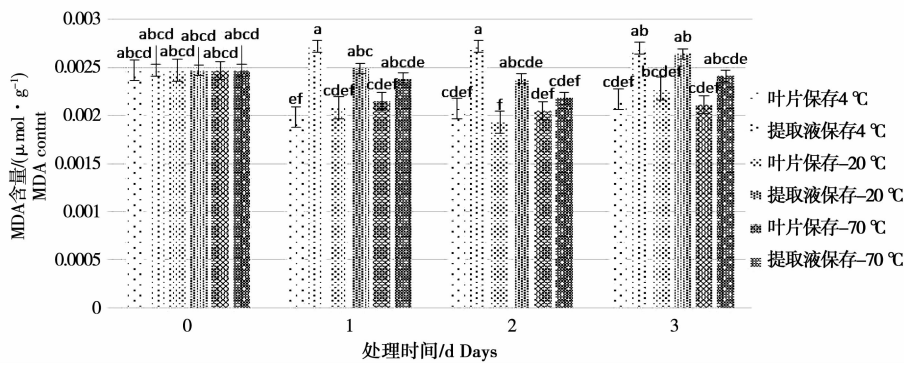


图 3 不同处理下 MDA 的含量变化

Fig. 3 The change of MDA content under different treatments

2.4 不同保存方式对秋石斛叶片 FPro 含量影响

由图 4 可看出,在相同保存温度条件下,随着保存时间的延长,FPro 含量呈现出线骤然升高,然后下降并趋于平稳的趋势。而在相同保存时间

条件下,随着温度的降低,FPro 含量呈现逐渐下降的趋势。在相同的保存温度和保存时间条件下,叶片保存的 FPro 含量和提取液保存之间没有显著性差异。

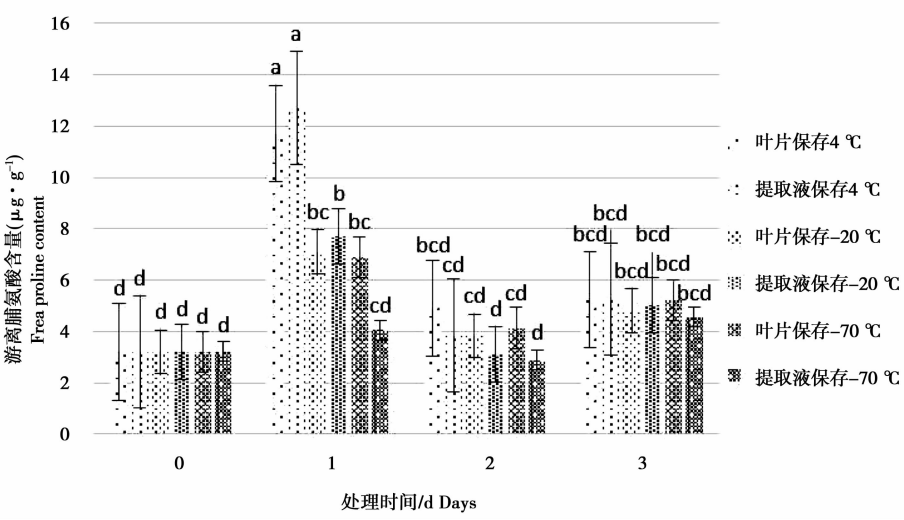


图 4 不同处理下游离脯氨酸的含量变化

Fig. 4 The change of free proline content under different treatments

3 结论与讨论

植物样品的保存对研究目标物的质量至关重要,相同植物种类在不同保存方法下的降解速度有所差异,因此,根据需求选择适宜的保存方法。但目前对植物样品保存对目标物提取质量的影响多集中于不同保存方式对 DNA 提取的影响,而保存方式对生理指标的影响却鲜有研究。生理指标是植物生理学研究的重要参考依据,如可溶性蛋白、叶绿素、MDA(丙二醛)、FPro(游离脯氨酸)等均是研究植物抗逆性的几个重要生理指标。

本研究通过测定不同保存方式对可溶性蛋白、叶绿素、MDA、FPro 的影响初步探索不同样品保存方式对植物生理指标测定的影响,以期能为植物生理指标测定的样品保存提供参考依据。研究表明,不同的保存方式对植物生理指标的测定具有较大的影响。

可溶性蛋白是植物逆境生理研究中衡量植物抗逆性强弱的指标之一,具有较强的亲水性,能明显增强细胞的持水力。可溶性蛋白含量的增加可以束缚更多的水分,对细胞的生命物质及生物膜

起到保护作用,从而提高植物体抗逆性^[5]。因此,可溶性蛋白含量是植物逆境生理研究中衡量植物抗逆性强弱的指标之一。可溶性蛋白含量随着保存时间的延长逐渐下降,表明不同保存方式下可溶性蛋白均会随着保存时间的延长而逐渐降解。

在逆境条件下,植物体内的蛋白质分解大于合成,导致叶绿体分解加强,叶绿素含量下降,最终致使植物的光合作用强度降低。因此,叶绿素含量是研究植物逆境胁迫的一个重要指标^[6]。叶绿素含量则变化不明显,表明叶绿素受保存方式及保存时间的影响较小,但王子飞等在研究不同叶片保存方式对色素的降解影响时发现,不同保存方式条件下,叶绿素含量均会出现下降的趋势,只是不同保存方式的降解速率不一致^[7],这与本研究结果不一致,可能是因为本研究设定的保存时间比较短,导致结果没有出现明显的趋势。

植物在遭受逆境胁迫时,细胞内活性氧产生与清除之间的平衡受到破坏,导致活性氧和自由基的积累,加速膜脂过氧化,其产物 MDA(丙二醛)的含量增加。在一定胁迫强度内,各种保护机制使得 MDA 维持在一定水平,胁迫强度超过特定阈值后,细胞内代谢失调,膜脂过氧化程度加大,MDA 含量升高,从而加剧质膜损伤。因此 MDA 含量的高低能反映细胞膜脂过氧化的程度以及对逆境反应的强弱^[8-15]。MDA 含量亦随着保存时间的延长出现下降,虽然同一温度保存条件下,保存 3 d 之内含量变化不明显,但却均比鲜叶对照低,表明 MDA 亦会随着保存时间的延长而逐渐降解。

FPro(游离脯氨酸)被认为是一种逆境下细胞质的有效渗透调节物质^[16],是植物体内重要的渗透调节物质,其含量与植物抗逆性之间存在相关性,常作为衡量植物抗逆性的重要生理指标^[17-20]。FPro 的含量则随着保存时间的延长出现较大的波动,表明样品的保存亦对 FPro 的测定具有较大的影响。

综上所述,在进行植物生理学指标测定的时候,应该尽可能的采用新鲜材料提取,但在条件不容许的情况下,用于可溶性蛋白测定的样品应于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,且应于 1 d 之内提取为好;用于叶绿素提取的样品保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件为佳;用于 MDA 提取的材料在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存均可,但保存时间不宜过长;游离脯氨酸由于保存之后含量出现较大波动,亦应尽可能的从新鲜材料

提取。

参考文献:

- [1] 卢思聪. 热带洋兰秋石斛(上)[J]. 中国花卉盆景, 2003(9): 4-5.
- [2] 陈泰教,何平荣,符岸军. 海南设施石斛兰的栽培管理技术[J]. 2009(6): 54-55.
- [3] 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, 2005.
- [4] 罗军武,唐和平,黄意欢. 茶树不同抗寒性品种间保护酶类活性的差异[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2001, 27(2): 94-96.
- [5] 郭爱华,陈钊钰,姚月俊. 自然降温对不同杏品种 1 年生枝条抗寒性的影响[J]. 山西林业科技, 2007(1): 33-34.
- [6] 王子飞,熊源新,罗睿. 不同植物叶片保存方法对色素降解的影响[J]. 贵州科学, 2013, 31(2): 65-68.
- [7] 孙骏威,杨勇,蒋德安. 水分亏缺下水稻的光化学和抗氧化应答[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2004, 30(3): 278-284.
- [8] 戴高兴,彭克勤,萧浪涛,等. 聚乙二醇模拟干旱对耐低钾水稻幼苗丙二醛、脯氨酸含量和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(5): 557-559.
- [9] Liang Y C, Hu F, Yang M C, et al. Antioxidative defenses and water deficit-induced oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) growing on non-flooded paddy soils with ground mulching[J]. Plant and Soil, 2003, 257(2): 407-416.
- [10] 蒋靛,庄杰云,樊叶杨,等. 与水稻耐逆性相关的叶片丙二醛含量的 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(4): 436-438.
- [11] 章秀福,王丹英,储开富,等. 镉胁迫下水稻 SOD 活性和 MDA 含量的变化及其基因型差异[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 194-198.
- [12] 潘晓华,刘水英,李锋,等. 低磷胁迫对不同水稻品种叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 57-60.
- [13] 冯绪猛,罗时石,胡建伟. 农药对水稻叶片丙二醛及叶绿素含量的影响[J]. 核农学报, 2003, 17(6): 481-484.
- [14] 易俗,王瑞兰,汪琼,等. 铈尾沙胁迫对水稻幼苗叶绿素含量、MDA 含量和 SOD 活性的影响[J]. 作物学报, 2004, 30(6): 626-628.
- [15] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [16] 王荣富. 植物抗寒指标的种类及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1987(3): 49-55.
- [17] 李美如,刘鸿江,王以柔. 植物细胞中的抗寒物质及其与植物抗冷性的关系[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(5): 328-334.
- [18] 陈发河,张维一. 低温胁迫对甜椒果实游离脯氨酸的影响[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(5): 365-368.
- [19] 冯建灿,张玉洁,杨天柱. 低温胁迫对喜树幼苗 SOD 活性 MDA 和脯氨酸含量的影响[J]. 林业科学研究, 2002, 15(2): 197-202.

(下转第 81 页)

科学,2011(S1): 131-134.

[10] 吴志丰,陈利顶. 热舒适度评价与城市热环境研究:现状特点与展望[J]. 生态学杂志,2016(5): 1364-1371.

[11] 张伟,郜志,丁沃沃. 室外热舒适性指标的研究进展[J]. 环境与健康杂志,2015(9): 836-841.

[12] 陈睿智,董靓. 湿热气候区风景园林微气候舒适度评价研究[J]. 建筑科学,2013(8): 28-33.

[13] 孙睿珩. 建筑室外风环境评估方法研究[J]. 长春工程学院学报:自然科学版,2015(2): 74-76.

[14] 宋培豪. 两种绿地布局方式的微气候特征及其模拟[D]. 郑州:河南农业大学,2013.

[15] 詹慧娟,解潍嘉,孙浩,等. 应用 ENVI-met 模型模拟三维植被场景温度分布[J]. 北京林业大学学报,2014(4): 64-74.

[16] 靳宁,景元书,武永利. 南京市不同下垫面对人体舒适度的影响分析[J]. 气候与环境研究,2009(4): 445-450.

Analysis on Microclimate Simulation of Small Square of Shanxi Agricultural University

WANG Fei¹, LIU Yan-hong²

(1. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801; 2. Institute of Urban and Rural Construction, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: The small square in Shanxi Agricultural University for teachers and students, is open space node and important for the study of its microclimate and comfort, through Envi-met the microclimate space, the choice of air temperature, wind speed, combined with thermal comfort analysis of the environment were simulated. The results showed that the overall temperature of the small square was rising to a downward trend, the wind speed increase first and then decreases, at last increasing trend. From 8:00 to 23:00, the ambient temperature increased, around 15:00 reached the peak, the gradually reduced. Winds from the morning around 10:00 substantially decreased, after 19:00 there was a slow recovery in the hard area. Human comfort in 10:00-20:00 was hot-hot-hot state. Small square ambient temperature was high, but wind speed, comfort inappropriate decreased.

Keywords: small square; microclimate; Envi-met; planning

(上接第 75 页)

Effects of Different Preserve Methods on Physiological Indexes in Leaves of *Dendrobium* spp.

HE Jia-qi^{1,2}, ZHANG Dong-xue², YIN Jun-mei¹, LU Shun-jiao¹

(1. Tropical Crops Genetic Resource Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Danzhou, Hainan 571737; 2. College of Horticulture and Landscape, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

Abstract: In order to discuss the effect of suitable condition and time of the sample preservation on different physiological indexes, using leaves of *Dendrobium* spp. as experiment materials which were treated in 4, -20 and -70 °C under 1, 2 and 3 days for leaf or extracting solution, the contents of soluble protein, chlorophyll, malondialdehyde and free proline were measured. The results showed that as preservation time extension, the content of soluble protein decrease, and the leaf saving in -70 °C for 1 day was most similar with control group. The contents of chlorophyll was first increased and then decreased finally stable with the prolonging of the storage time. And the content saving as leaf or extracting solution in -70 °C for 2 days was most similar with control group under treatment temperature. There was a slight fluctuation in the content of MDA in different temperature or time treatments, but the difference was not significant. As preservation time extension, the content of free proline showed a sudden rise then decrease and finally stability at different temperatures treatment, and the extracting solution saving in -70 °C for 2 days was most similar with control group.

Keywords: leaves of *Dendrobium*; temperature; physiological indexes