

不同低温胁迫对两种沉香幼苗抗寒性的影响

向振勇^{1*}, 楚永新², 邵杨建³, 谷丽萍⁴, 郑科^{1#}

¹云南省林业和草原科学院/国家林业和草原局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 云南省林业和草原科学院林业研究所, 云南 昆明

²红河哈尼族彝族自治州林业和草原科学研究所, 云南 蒙自

³云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明

⁴云南省林业和草原科学院林业研究所, 云南 昆明

收稿日期: 2021年12月13日; 录用日期: 2022年1月20日; 发布日期: 2022年1月28日

摘要

以厚壳沉香(*Aquilaria crassna*)和白木香(*Aquilaria sinensis*)叶片作为处理材料, 研究不同低温处理下两种沉香叶片中脯氨酸、可溶性蛋白质、可溶性糖以及丙二醛、电导率等指标变化, 采用Fuzzy数学隶属函数对2种沉香进行抗寒性综合评价。结果表明: 2种沉香的抗寒能力均随着温度下降而先升高后降低, 对2种沉香的抗寒性综合评价得知白木香抗寒能力强于厚壳沉香。我们认为沉香在低于5℃的环境中, 很难成活, 尤其是温度低于2℃以后, 持续1天以上, 植株会大量死亡, 在大规模繁殖中, 低温冻害应是重点考虑因素。

关键词

沉香, 抗寒性, 综合评价, 生理指标

Effects of Different Low Temperature Stress on Cold Resistance of Two Kinds of *Aquilaria* Seedlings

Zhenyong Xiang^{1*}, Yongxin Chu², Yangjian Shao³, Liping Gu⁴, Ke Zheng^{1#}

¹Yunnan Academy of Forestry and Grassland/Yunnan Laboratory for Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, National Forestry and Grassland Administration, Kunming Yunnan

²Institute of Forestry and Grassland Science, Honghe Hani and Yi Autonomous prefecture, Mengzi Yunnan

³College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan

⁴Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Forestry Research Institute, Kunming Yunnan

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

The leaves of *Aquilaria crassna* and *Aquilaria sinensis* were used as treatment materials to study the changes of proline, soluble protein, soluble sugar, malondialdehyde and electrical conductivity in two kinds of *Aquilaria* leaves under different low temperature treatment. The cold resistance of the two kinds of *Aquilaria* was evaluated comprehensively by fuzzy mathematical membership function. The results showed that the cold resistance of the two kinds of *Aquilaria* increased at first and then decreased with the decrease of temperature. The comprehensive evaluation of the cold resistance of the two kinds of *Aquilaria* showed that the cold resistance of *Aquilaria sinensis* was stronger than that of *Aquilaria crassna*. We believe that it is difficult for *Aquilaria* to survive in an environment below 5°C, especially when the temperature is lower than 2°C and lasts for more than one day, a large number of plants will die. Low temperature freezing injury should be a key factor in large-scale propagation.

Keywords

Aquilaria, Cold Resistance, Comprehensive Evaluation, Physiological Index

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

沉香是由结香植物受伤分泌的物质与微生物反应生成的特殊物质[1]。能够产生这些特殊物质的结香树种主要是瑞香科(*Thymelaeaceae*)的沉香属(*Aquilaria*)和拟沉香属(*Gyrinops*)中的植物,这两个属的植物均处于濒危野生动植物种国际贸易公约清单列表(CITES)之中。我国有白木香(*Aquilaria sinensis*)和云南沉香(*Aquilaria yunnanensis*) 2种沉香资源,为了缓解国内巨大的沉香市场压力,云南省积极引进了部分沉香种质资源,这些资源绝大部分生长于南亚、东南亚的热带和亚热带地区。由于其原生境常年温暖湿润的气候特点,在选择引种保存地时考虑的首要因素应是引种的沉香资源对引种地最低温的耐受程度。沉香引种资源的田间抗寒性研究由于周期较长,可供试的种质资源有限,可控程度低等特点而难于开展;利用室内人工模拟低温冰冻试验,可以完成沉香苗木受冻害后的生理生化指标测定比较,能够有效弥补田间试验的不足。

本文研究了2种沉香幼苗叶片在不同温度胁迫下的丙二醛(MDA)、脯氨酸(Proline)、可溶性蛋白质、及可溶性糖含量的变化,根据这些生理生化指标的变化,采用了Fuzzy数学隶属函数综合评判法对厚壳沉香(*Aquilaria crassna*)和白木香(*Aquilaria sinensis*)的抗寒性进行了综合评判,结合2种沉香在玻璃温室内2年以上的成活率统计判断,本研究可为两种沉香的异地引种植提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

本试验以厚壳沉香和白木香的实生幼苗为研究材料,厚壳沉香来源于越南,白木香来源于云南省林

业和草原科学院、2 种沉香均引种植于云南省林业和草原科学院国家林业和草原局云南珍稀濒危特森林植物保护和繁育重点实验室的玻璃温室。

2.2. 试验方法

在玻璃温室内选取长势一致, 生长良好的两种沉香树幼苗的枝叶, 装入透明的塑料自封袋内, 写好各自处理的标签, 封好自封袋口后放入不同的人工气候箱中, 将人工气候箱以 25℃ 为基准起始温度, 按每 2 h 降温 2℃ 的梯度进行降温暗培养处理, 处理时, 人工气候箱湿度统一为 85%, 待到达目标温度(0℃、5℃、10℃、15℃、20℃ ± 1℃)时, 维持目标温度 24 h, 每个温度处理设 3 次重复, 将不同温度处理下的沉香叶片取出, 并从同一处理的叶片中随机选取部分沉香叶片, 用蒸馏水将沉香叶片冲洗干净, 滤纸吸干叶片表面的水分, 然后进行相关指标的测定。

2.3. 测定指标

丙二醛 MDA 含量采用硫代巴比妥酸法(TBA)测定, 脯氨酸 Proline 含量采用茚三酮比色法测定, 可溶性蛋白采用考马斯亮蓝法测定, 可溶性糖含量用蒽酮法测定, 电导率用电导率仪测定, 将处理后叶片称取 0.5 g 样品, 剪成细条状, 放入带刻度的具塞试管中, 准确加入 20 mL 纯净水浸没样品浸泡 24 h, 稍稍震荡混匀后, 测定电导率 R_1 , 然后将试管放入 100℃ 的沸水中煮沸 40 min, 取出试管冷却至室温, 测定电导率 R_2 , 纯净水电导率记为 CK [2] [3] [4]。成活率统计以在玻璃温室内栽培的沉香苗为基础, 统计了 2020 年、2021 年经历 2 年冬季低温后的幼苗成活率。

2.4. 数据处理

参考曾雯珺[4] [5] [6]的方法, 计算细胞伤害率,
$$\text{细胞伤害率} = \frac{R_1 - \text{CK}}{R_2 - \text{CK}} \times 100。$$

参考王宁等[7]-[12]的方法进行数据处理, 应用 Fuzzy 数学中隶属函数法进行综合评判[12]。其计算公式如下: 1) 对与抗寒性正相关的可溶性糖、可溶性蛋白质和脯氨酸, 采用公式: $f(x_{ij}) = (X_{ij} - X_{j\min}) / (X_{j\max} - X_{j\min})$; 2) 对与抗寒性呈负相关的 MDA 含量及电导率, 采用下列公式: $f(x_{ij}) = 1 - (X_{ij} - X_{j\min}) / (X_{j\max} - X_{j\min})$ 。式中 $f(x_{ij})$ 为 i 树种的 j 项指标隶属函数值; X_{ij} 为其测定值; $X_{j\max}$ 和 $X_{j\min}$ 分别为 j 指标最大的测定值和最小测定值[11]。

试验数据采用 Excel 和 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析。

3. 结果与分析

3.1. 脯氨酸 Proline 含量变化

脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质, 它有利于稳定植物体内蛋白质结构和保护植物细胞内的大分子物质。见图 1 可知, 随着温度的降低, 两种沉香叶片内的脯氨酸含量均是先升高后降低的现象。在 20℃~10℃ 区间时, 厚壳沉香的脯氨酸含量都比白木香的脯氨酸含量高; 而当温度下降到 5℃~0℃ 区间时, 厚壳沉香的脯氨酸含量显著比白木香脯氨酸含量低, 这可能是因为两种沉香对低温胁迫的耐受能力不同。

3.2. 可溶性蛋白含量变化

植物体内的可溶性蛋白质绝大多数是参与各种代谢的酶类, 其含量的变化可以反应出随着温度的胁迫, 植物体内的代谢强度。见图 2 可以看出, 随着温度下降, 2 种沉香的可溶性糖含量先升高后降低。说明随着温度的下降, 2 种沉香都是通过加强体内代谢来增强降温后的抗胁迫能力。但是当温度下降到

一定程度后, 其可溶性蛋白质含量显著下降, 即代谢强度显著下降, 说明在此温度下已经超过了沉香抗低温胁迫的承受范围。同时, 图 3 也可看出, 在不同温度胁迫下, 厚壳沉香的可溶性糖含量均高于白木香的可溶性糖含量, 说明厚壳沉香的抗寒胁迫能力要强于白木香的抗寒能力。

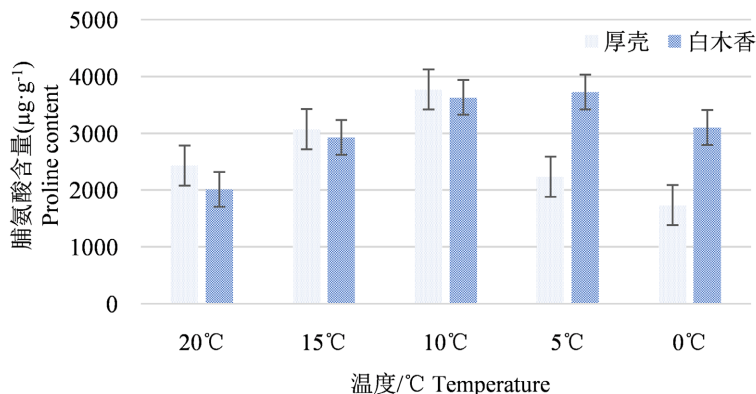


Figure 1. Proline content of two kinds of *Aquilaria* at different temperatures

图 1. 2 种沉香在不同温度下脯氨酸含量

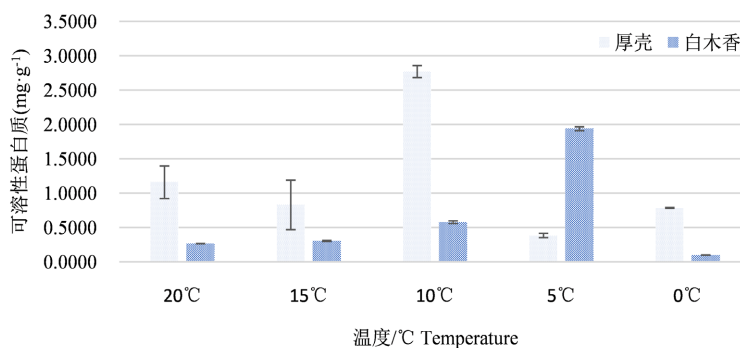


Figure 2. Soluble protein content of two kinds of *Aquilaria* at different temperatures

图 2. 2 种沉香在不同温度下的可溶性蛋白质含量

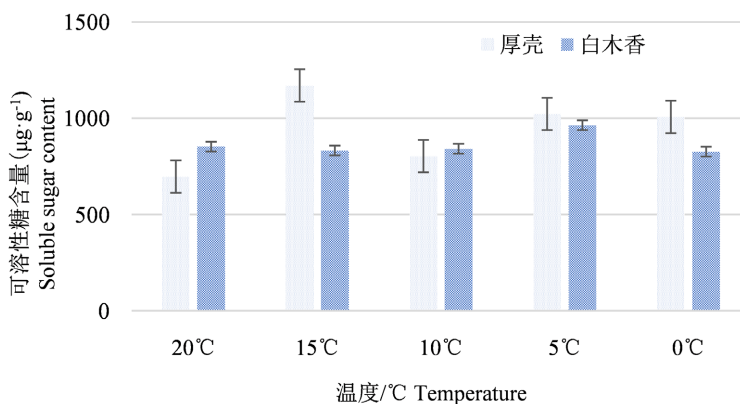


Figure 3. Soluble sugar content of two kinds of *Aquilaria* at different temperatures

图 3. 2 种沉香不同温度下可溶性糖含量

3.3. 可溶性糖含量变化

见图 3 可知, 2 种沉香在不同的温度下可溶性糖含量随着温度的下降呈现先升高后降低的趋势。2 种沉香在适度的低温胁迫中, 通过增加可溶性糖含量来增强其抗低温胁迫的能力。随着温度进一步下降, 可溶性糖含量均出现明显下降, 表明其调节能力下降, 超过了 2 种沉香的承受范围。

3.4. 丙二醛(MDA)含量的变化

见图 4 可以看出, 随着温度的降低, 两种沉香的 MDA 含量呈现出上升的趋势。植物中 MDA 含量增加通常认为是细胞中的保护酶活性及渗透调节物质的增加有关。图 1 中显示, 厚壳沉香的 MDA 含量基本高于白木香的, 说明厚壳沉香的膜脂过氧化程度要高于白木香。两种沉香 MDA 含量均在 20℃ 时最低, 在 5℃ 情况下最高。

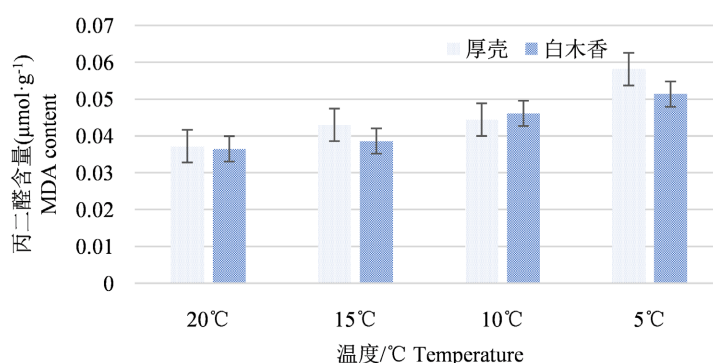


Figure 4. MDA content of two kinds of *Aquilaria* at different temperatures
图 4. 2 种沉香不同温度下 MDA 含量

3.5. 电导率变化及低温存活率

随着低温胁迫的加重, 2 种沉香的相对电导率增大(见图 5)。当温度降到 5℃ 时, 电导率接近 50%, 即 5℃ 附近达到沉香的半致死温度, 当温度低于 5℃ 时, 沉香会受冻致死。

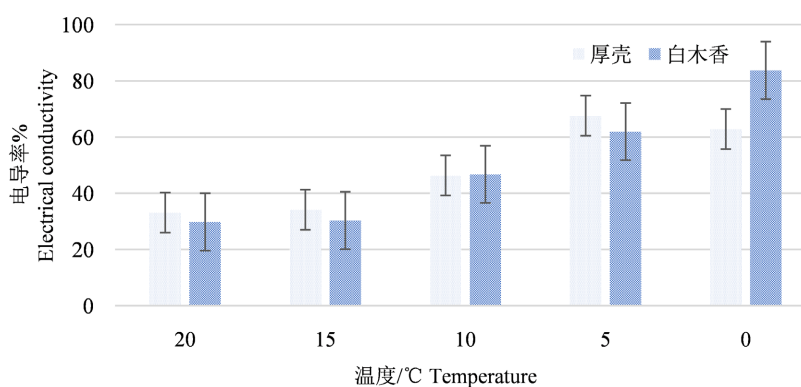


Figure 5. The changes of electrical conductivity of two kinds of *Aquilaria* at different temperatures
图 5. 2 种沉香不同温度下相对电导率变化

将 2 种沉香放置于无加温设施的玻璃温室内, 经过 2019 年 12 月 7 日、2020 年 1 月 25 日的低温, 室外最低温 -2℃, 持续 1~2 天, 玻璃温室内最低温度为 2℃~5℃, 到 2021 年 5 月中旬检查 2 种沉香的成

活率,发现厚壳沉香成活率 20%,白木香成活率 30% (见表 1)。

Table 1. Survival rate of two kinds of *Aquilaria* after low temperature in winter

表 1. 白 2 种沉香在经历冬季低温后的成活率

| 种 | 2020 年 1 月 25 日 玻璃大棚温度(°C) | 2021 年 1 月 16 日 玻璃大棚温度(°C) | 冻害持续时间(d) | 总株数 (株) | 冻害后成活 株数(株) | 成活率 (%) |
|------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|------------|----------------|------------|
| 厚壳沉香 | 4~5 | 2~4 | 1~2 | 30 | 6 | 20% |
| 白木香 | 4~5 | 2~4 | 1~2 | 30 | 9 | 30% |

3.6. 不同低温胁迫对 2 个沉香的隶属度值与综合评价指标

3.6.1. 不同低温胁迫的各抗寒指标隶属值

白木香在低温胁迫过程中各抗寒指标隶属函数值见表 2。其抗寒性呈现出“先升后降”的变化趋势,在温度从 20°C 降到 5°C 的过程中,白木香表现出抗寒性增强,在 5°C 时,其综合评判数值最高,即在 5°C 时,其抗寒能力最强;而当温度从 5°C 降到 0°C 时,白木香的抗寒性快速下降,说明温度低于 5°C 时白木香抗寒能力快速下降。

Table 2. Data analysis of cold resistance indexes of *Aquilaria sinensis* under low temperature stress

表 2. 白木香低温胁迫过程中各抗寒指标数据分析

| 处理温度(°C) Treatment | MDA 含量 MDA content | 相对电导率 conductivity | 可溶性蛋白 Soluble protein | 脯氨酸 Proline | 可溶性糖 Soluble sugar | 综合评判 Synthetic evolution | 评序 SN |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|----------|
| 0 | - | 0.8367 | 0.0971 | 3099.9488 | 825.8364 | 3925.7190 | 3 |
| 5 | 0.05136 | 0.6190 | 1.9390 | 3725.2605 | 963.7322 | 4691.6021 | 1 |
| 10 | 0.04609 | 0.4674 | 0.5773 | 3628.7671 | 842.0017 | 4471.8596 | 2 |
| 15 | 0.0386 | 0.3028 | 0.3041 | 2928.0669 | 832.1766 | 3760.8890 | 4 |
| 20 | 0.03643 | 0.2978 | 0.2634 | 2013.7783 | 853.1403 | 2867.5162 | 5 |

厚壳沉香在低温胁迫过程中各项抗寒性指标数据分析见表 3。其抗寒性也是呈现出先升高后降低的趋势,说明在低温胁迫过程中,厚壳沉香的抗寒性出现了先增强后减弱的现象。在温度从 20°C 降到 10°C 的过程中,厚壳沉香抗寒性逐渐增强;当温度达到 10°C 时,其综合评判数值最大,即在该温度下,其抗寒能力最强。10°C 到 0°C 的降温过程中,其抗寒性快速下降,即温度低于 10°C 后,厚壳沉香抗寒能力快速下降。

Table 3. Data analysis of cold resistance indexes of *Aquilaria crassna* under low temperature stress

表 3. 厚壳沉香在低温胁迫过程中各项抗寒指标数据分析

| 处理温度(°C) Treatment | MDA 含量 MDA content | 相对电导率 conductivity | 可溶性蛋白 Soluble protein | 脯氨酸 Proline | 可溶性糖 Soluble sugar | 综合评判 Synthetic evolution | 评序 SN |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|----------|
| 0 | - | 0.6278 | 0.7844 | 1735.8114 | 1206.8782 | 2944.1018 | 5 |
| 5 | 0.0581 | 0.6755 | 0.3830 | 2234.0976 | 1022.2621 | 3257.4763 | 3 |
| 10 | 0.0444 | 0.4634 | 2.7717 | 3770.0823 | 803.6244 | 4576.9862 | 1 |
| 15 | 0.0430 | 0.3412 | 0.8286 | 3069.6642 | 1169.9765 | 4240.8535 | 2 |
| 20 | 0.0372 | 0.3309 | 1.1597 | 2428.8586 | 697.1733 | 3127.5597 | 4 |

3.7. 抗寒性综合评价

根据表 4 中 2 种沉香不同温度处理后的各指标数据的隶属函数值, 计算各指标的平均值, 最后得出两种沉香的综合评价值, 该数值越大, 即抗性越强。表 3 可见, 白木香的综合评判数值为 3943.2125, 比厚壳沉香要高, 即白木香的抗寒能力要强于厚壳沉香。

Table 4. Comprehensive evaluation of cold resistance of two species of *Aquilaria*

表 4. 2 种沉香抗寒性综合评价

| 处理温度(°C) Treatment | MDA 含量 MDA content | 相对电导率 Conductivity | 可溶性蛋白 Soluble protein | 脯氨酸含量 Proline | 可溶性糖 Soluble sugar | 综合评判 Synthetic evolution | 评序 SN |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|----------|
| 厚壳 | 0.0365 | 0.4830 | 1.1855 | 2647.7028 | 979.9829 | 3628.9077 | 2 |
| 白木香 | 0.0345 | 0.4371 | 0.6362 | 3079.1643 | 863.3774 | 3943.2125 | 1 |

4. 讨论

在本研究中, 分别计算了 2 种沉香在不同温度胁迫下各指标的 Fuzzy 隶属函数值, 最后再计算各个温度胁迫下的综合评价数值。我们发现, 2 种沉香的抗寒性均是按照“先升后降”的趋势进行变化, 这一变化趋势与其他人的研究结果一致[9] [10] [11] [12]。不同在于, 各个树种忍受的低温温度差异。我们认为这应该是随着低温胁迫的增强, 2 种沉香的细胞内发生了一些生理生化变化, 使得各种生化指标随着胁迫的增强而呈现出先升高, 后来由于胁迫增强, 当细胞膜的结构遭到破坏, 发生了一些不可逆的变化后, 一些生化指标又急速降低, 使得总体来看, 2 种沉香呈现出随着温度的降低, 其抗寒能力先升后降的变化趋势。对这 2 种沉香在不同处理温度下电导率进行测定, 发现随着处理温度的降低, 电导率越来越大, 当处理温度下降到一定时, 电导率变化趋于平缓。这也进一步验证了 2 种沉香叶片的细胞膜在温度下降到一定低温的过程中, 其膜结构会遭到破坏, 发生一些不可逆的伤害, 并最终导致植株死亡。

植物的抗寒性是一系列的生理生化特征综合作用的遗传表现, 单一的抗寒指标并不能够直接判断植物对低温的综合适应能力[9] [10] [11], 但是同时测定多个抗寒性生理指标, 应用这些指标再进行综合评价, 则能够较好地获得满意的结果[12] [13] [14] [15]。本研究表明, 2 种沉香的各单项指标的变化值与综合抗寒性评价结果并不完全一致, 但是在将这个单项结果进行综合评价, 则能相对准确地反映出不同沉香种之间抗寒能力的强弱关系。本研究表明: 白木香的抗寒能力比厚壳沉香要强。

一般剧烈的降温和连续的冰冻, 对植物的伤害较大; 而缓慢的降温, 对植物的伤害较轻。在鉴定植物的抗寒性试验中, 需要采用合适的研究方法, 才能对植物抗寒性程度加以量化描述[16] [17] [18] [19] [20]。本试验结果采取离体条件下测定与玻璃温室实际成活相结合的方式, 能够准确反映出 2 种沉香真实的耐寒性, 我们认为沉香在低于 5°C 的环境中, 很难成活, 尤其是温度低于 2°C 以后, 持续 1 天以上, 植株会大量死亡, 在大规模繁殖中, 低温冻害应是重点考虑因素。

基金项目

沉香木种质资源及扩繁栽培技术引进归化研究(2017IB012); 云南省“万人计划”产业领军人才(YNWR-CYJS-2018-043)。

参考文献

- [1] 董梦好, 焦立超, 姜笑梅, 等. 沉香的资源分布、识别与贸易现状[J]. 木材工业, 2016, 30(4): 20-24.
- [2] 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.

-
- [3] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] 曾雯珺, 江泽鹏, 陈伟, 等. 广西油茶主栽无性系低温半致死温度与耐寒性研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(4): 23-25.
- [5] 赵奇, 范春丽, 杨玉珍, 等. 电导法配合 Logistic 方程比较 16 种校园植物抗寒性[J]. 山东农业科学, 2015, 47(7): 53-55.
- [6] 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的研究[J]. 南京农业大学学报, 1986(3): 11-16.
- [7] 陈路, 柯善强. Logistic 方程在植物细胞培养研究中的应用[J]. 植物学通报, 1994, 11(3): 62-64.
- [8] 李嘉诚. 14 个品种(系)平欧杂种榛抗寒性比较[J]. 东北林业大学学报, 2018, 46(10): 29-35.
- [9] 王宁, 袁美丽, 丁博. 低温胁迫对两种樟树抗寒性生理的影响[J]. 山东农业大学学报, 2016, 47(1): 37-42.
- [10] 王小媚, 任惠, 刘业强, 等. 低温胁迫对杨桃品种抗寒生理生化指标的影响[J]. 西南农业学报, 2016, 29(2): 270-275.
- [11] 苏李维, 李胜, 马绍英, 等. 葡萄抗寒性综合评价方法的建立[J]. 草业学报, 2015, 24(3): 70-79.
- [12] 令凡, 焦健, 李朝周, 等. 不同油橄榄品种对低温胁迫的生理响应及抗寒性综合评价[J]. 西北植物学报, 2015, 35(3): 508-515.
- [13] 李轶冰, 杨顺强, 任广鑫, 等. 低温处理下不同禾本科牧草的生理变化及其抗寒性比较[J]. 生态学报, 2009, 29(3): 1341-1347.
- [14] 柳新红, 何小勇, 苏冬梅, 等. 翅荚木种源抗寒性综合评价体系的构建与应用[J]. 林业科学, 2007, 43(10): 45-50.
- [15] 吕跃东, 董风祥, 王贵禧, 等. 平欧杂交榛抗寒性综合评价体系的建立与应用[J]. 林业科学, 2008, 44(9): 31-35.
- [16] 曹冉, 王海洋. 11 种常绿阔叶树的抗寒力研究[J]. 西南大学学报, 2014, 36(8): 57-64.
- [17] 郭伟珍, 赵京献, 李莹, 等. 以电导法评价 10 个梨品种(系)的抗寒性[J]. 落叶果数, 2020, 52(6): 18-22.
- [18] 宋殿臣. 三种槭树三年生幼苗抗寒性研究[J]. 中国林副特产, 2019(1): 29-30.
- [19] 唐雯, 陈健妙, 左金富, 等. 基于 Logistic 方程分析方法的木瓜属观赏植物耐寒性研究[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(6): 108-111.
- [20] 赵滢, 艾军, 杨义明, 等. TTC 染色指数配合 Logistic 方程鉴定山葡萄种质抗寒性[J]. 农业工程学报, 2018, 34(11): 174-180.