

4个北美冬青品种苗对低温胁迫的生理响应及抗寒性比较

马娟娟,赵 斌,陈 颖*,凌熙晨,俞 婕,陈 茜

(南京林业大学生物与环境学院,南方现代林业协同创新中心,江苏 南京 210037)

摘要:【目的】探究不同品种北美冬青的抗寒性,为北美冬青新品种苗木的推广和研究提供参考。【方法】以4个引进的北美冬青(*Ilex verticillata*)品种‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’和‘Winter Gold’2年生扦插苗枝条为试验材料,通过0、-7、-17、-27℃低温逐级降温分别处理24 h,研究4个品种北美冬青对低温胁迫的生理响应及抗寒性差异。【结果】4个品种的相对电导率和MDA(丙二醛)含量均随着温度的降低而增加,都在-27℃时达到最高。‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’和‘Winter Gold’的低温半致死温度(LT50)分别为-26.38、-24.26、-29.19和-20.04℃。随着处理温度的降低,渗透调节物质可溶性糖、可溶性蛋白及脯氨酸含量在处理温度>-17℃时都出现增加(‘Winter Gold’的可溶性糖含量最高点在-27℃),但各品种各指标峰值出现的温度点不同。H₂O₂含量与SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)酶活性同时在-17℃时达到最高,而CAT(过氧化氢酶)酶活性在-27℃时急剧增加,说明3种酶对活性氧的清除存在温度效应。【结论】4个品种中‘Oosterwijk’与‘Gray’的抗寒性在整体水平上强于其他2个品种,通过隶属函数和权重综合分析,得出4个北美冬青品种的抗寒能力由强到弱依次为:‘Oosterwijk’、‘Gray’、‘Red Sprite’、‘Winter Gold’。

关键词:北美冬青品种;低温胁迫;生理响应;抗寒性评价

中图分类号:S688 文献标志码:A 开放科学(资源服务)标识码(OSID):
文章编号:1000-2006(2020)05-0034-07



Physiological responses of seedlings of four *Ilex verticillata* varieties to low temperature stress and a comparison of their cold resistance

MA Juanjuan, ZHAO Bin, CHEN Ying*, LING Xichen, YU Jie, CHEN Xi

(Co-Innovation Center for the the Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: 【Objective】 Investigating the cold resistance of four *Ilex verticillata* varieties provides a guidance and a reference for seedling promotion and research of these new varieties. 【Method】The physiological responses of four *I. verticillata* varieties (‘Red Sprite’, ‘Gray’, ‘Oosterwijk’ and ‘Winter Gold’) to low temperature stress were studied by exposing their branches to temperature treatments of 0℃, -7℃, -17℃ and -27℃ for 24 h. Cold resistance of the four varieties was compared. 【Result】The relative conductivity and malondialdehyde content of the four varieties increased with a decrease in temperature, and reached a maximum at -27℃. The low temperature semi-lethal temperatures for ‘Red Sprite’, ‘Gray’, ‘Oosterwijk’ and ‘Winter Gold’ were -26.38℃, -24.26℃, -29.19℃ and -20.04℃, respectively. Associated with the decrease in treatment temperature, there was an increase in the soluble sugar, soluble protein, and proline contents and osmotic regulators at > -17℃ (the soluble sugar of ‘Winter Gold’ reached its highest point at -27℃); however, the appearance of peak temperature for each variety was different. The H₂O₂ content and the activity of superoxide dismutase and peroxidase all reached their highest value at -17℃. The ac-

收稿日期:2020-03-19 修回日期:2020-05-15
基金项目:江苏省科技计划重点项目(BE2017375);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD);南京林业大学大学生创新训练计划项目(2019NFUSPITP0448)。
第一作者:马娟娟(1597648516@qq.com)。*通信作者:陈颖(chynjfu@163.com),教授,ORCID(0000-0002-8848-6193)。
引文格式:马娟娟,赵斌,陈颖,等. 4个北美冬青品种苗对低温胁迫的生理响应及抗寒性比较[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2020,44(5):34-40.MA J J, ZHAO B, CHEN Y, et al. Physiological responses of seedlings of four *Ilex verticillata* varieties to low temperature stress and a comparison of their cold resistance[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2020, 44(5): 34-40. DOI:10.3969/j.issn.1000-2006.202003059.

tivity of the catalase enzyme increased sharply at $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicating that the three enzymes had a temperature effect on the scavenging of reactive oxygen species.【Conclusion】The cold resistance of ‘Oosterwijk’ and ‘Gray’ was stronger than that of the other two varieties as a whole. Through the comprehensive analysis of membership function and weight value, the order of cold resistance of the four *I. verticillata* varieties, from strong to weak was: ‘Oosterwijk’ > ‘Gray’ > ‘Red Sprite’ > ‘Winter Gold’.

Keywords: *Ilex verticillata* varieties; low temperature stress; physiological response; cold resistance evaluation

北美冬青 (*Ilex verticillata*) 是生长于美洲东北部的优良观果树种^[1-2]。因与一般的冬青科植物不同,秋冬季落叶因此又称为落叶冬青。该植物冬季落叶后红色或黄色果实挂满枝头,有望成为国内冬季重要的观果树种。目前已从北美洲引进该属植物达 12 个品种(包括雄株品种)^[3]。经过几年的苗木推广,目前有的品种如‘奥斯特’已经在哈尔滨、长春、北京、甘肃、湖南、山东、浙江、福建一带推广种植,但研究显示在北京、济南、潍坊等地栽培适应性较差^[4-6],可见北美冬青对生境有一定要求和选择性^[7]。因此在大量引种栽培前,为避免因盲目栽培而造成不必要的损失,对这些引进品种的抗寒性和适应性进行研究显得尤为必要,目前尚未见有关北美冬青品种抗寒性的报道。

本研究以引进的 4 个落叶型北美冬青 (*Ilex verticillata*) 新品种 ‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’ 及 ‘Winter Gold’ 的 2 年生扦插苗为试验材料,研究不同低温对其生长及生理代谢的影响,并通过隶属函数和权重等指标分析,对 4 个品种的抗寒性进行比较,为这些品种在各地的引种和北移及其适应性提供参考,进而更好地指导其引种栽培和科学研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

4 个落叶型北美冬青 (*Ilex verticillata*) 品种分别为 ‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’ 及 ‘Winter Gold’ 2 年生扦插苗,其中 ‘Red Sprite’ 引自美国,其他品种来自杭州闰土园艺有限公司和南京青珠果园艺有限公司。苗木移植到 $15\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 12\text{ cm}$ 的花盆中,栽培基质为营养土、蛭石、珍珠岩,体积比为 2:1:1,每盆种植 1 株,置于南京林业大学的人工气候室内,生长温度为 $(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度为 $160\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照时间为 14 h/d。

1.2 处理方法

选择长势良好、生长一致、无病虫害的 2 年生扦插苗为试验材料,低温处理前,对 4 个北美冬青品种进行预冷锻炼处理。在气候室内从 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开

始,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为梯度进行逐级降温,分别在 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时进行 3 d 的预冷锻炼处理。

预冷锻炼结束后,剪取 4 个落叶型冬青品种长势一致、健壮、无病虫害的中下部枝条(长约 20 cm),清洗干净、滤纸吸干水分、切口两端封蜡后放入自封袋中,进行 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不同低温胁迫处理。低温处理采用逐级降温的方式,即从 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开始,每到达设定温度后维持 24 h,取样,再进行下一级温度处理 24 h,以此类推,以 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 24 h 的枝条为对照。将处理后的样品在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 常温冰箱中缓慢解冻 8 h 后,剪碎(去除封蜡部分)进行各项指标测定。各试验设 3 次重复,每个处理 10 根枝条。

1.3 生理指标测定

相对电导率(relative electrical conductivity, REC,质膜透性)、过氧化氢含量(H_2O_2 ,硫酸钛法)的测定参照文献[8]的方法;丙二醛(MDA)、可溶性糖(SS,蒽酮法)、可溶性蛋白(SP,考马斯亮蓝 G-250 法)、脯氨酸(Pro,磺基水杨酸法)含量,以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的测定均参照文献[9]的方法。

1.4 半致死温度

通过 Logistic 回归方程 $y = k/(1 + ae^{-bx})$,计算半致死温度。其中: y 为相对电导率, x 为处理温度, k 为细胞伤害率的饱和容量, a 、 b 为曲线方程的参数^[10]。根据王国霞等^[11]的方法,将 k 设为 100%,计算得出 a 、 b 和决定系数 R^2 的值,半致死温度(LT50,记为 T_{L50})根据 $T_{L50} = \ln a/b$ 求得。

1.5 隶属函数法综合评价植物的抗寒性

参照刘旭梅等^[12]通过隶属函数、权重综合分析法进行抗寒性评价。隶属函数计算公式为: $U(X_i) = (X_i - X_{\min})/(X_{\max} - X_{\min})$;若所测指标与植物抗寒性呈负相关,则采用反隶属函数计算公式: $U(X_i) = 1 - (X_i - X_{\min})/(X_{\max} - X_{\min})$ 。式中: $U(X_i)$ 表示各品种 i 指标抗寒性隶属函数值, X_i 表示各品种 i 指标的测定值, $X_{\max}$ 与 $X_{\min}$ 分别表示 i 指标测定值的最大值与最小值。并计算指标权重系数和各品种的综合评价(D 值)^[12], D 值越大植物抗寒性越强。

1.6 数据处理

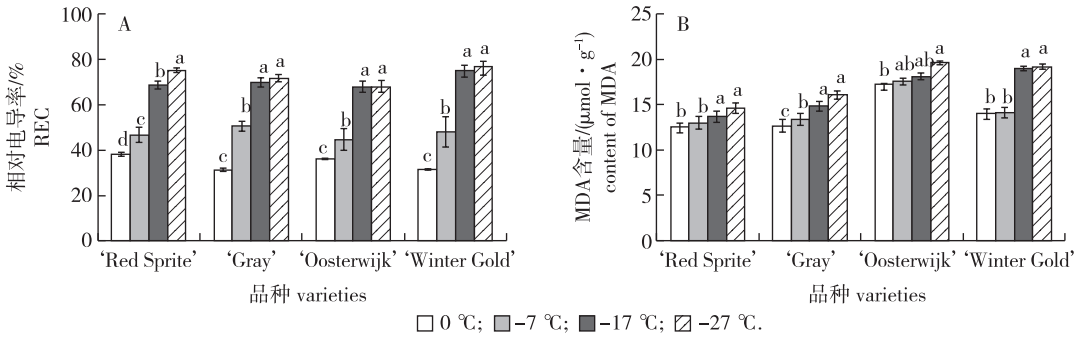
采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行处理和作图,SPSS 20.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下 4 个北美冬青品种相对电导率、半致死温度及 MDA 含量的变化

4 个北美冬青品种的相对电导率均随着处理温

度的降低呈上升趋势(图 1A),在降到-7℃时相对电导率上升比较缓慢,但当温度降至-17℃时,各品种的相对电导率上升幅度加大,从-17℃降低至-27℃时,上升幅度又变缓。在-27℃时,4 个品种的相对电导率均达到最大值,与对照存在显著差异($P<0.05$),其中,‘Gray’和‘Winter Gold’的相对电导率比对照分别提高了 128.9%和 143.5%,品种‘Red Sprite’和‘Oosterwijk’的比对照提高了 97.2%和 87.7%。



不同小写字母代表 $P<0.05$ 水平上差异显著。下同。Different letters indicate significant differences at $P<0.05$ level. The same below.

图 1 低温胁迫对落叶型冬青相对电导率和 MDA 含量的影响

Fig.1 Effects of low temperature stress on relative electric conductivity and MDA content of four *Ilex verticillata* varieties

随着处理温度的降低,4 个北美冬青品种的 MDA 含量变化与相对电导率出现相同的规律,即随着温度的不断降低,MDA 含量均出现不同程度的增加,在降到-7℃时 MDA 含量增加幅度较小;降至-17℃时 MDA 含量快速增加,其中‘Winter Gold’的 MDA 含量增加幅度(34.5%)大于其他品种,与对照存在显著差异($P<0.05$);温度降至-27℃时 MDA 含量又缓慢增加。与对照相比,4 个北美冬青品种中,‘Winter Gold’的 MDA 含量增加值最大,达 36.9%,‘Oosterwijk’的增加值最小为 13.8%($P<0.05$,图 1B)。

根据 4 个北美冬青品种在低温胁迫下相对电导率的变化,通过 Logistic 拟合回归方程 $y=k/(1+ae^{-bx})$,计算得出各品种的半致死温度(LT₅₀)见表 1。4 个北美冬青品种的低温半致死温度有较大的差异,但各品种的低温半致死温度均在-20~-30℃,显示出较强的抗寒性。‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’和‘Winter Gold’的低温半致死温度分别为-26.4、-24.3、-29.2 和-20.0℃。通过半致死温度得出 4 个落叶型冬青品种的抗寒能力由强到弱顺序为:‘Oosterwijk’、‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Winter Gold’(表 1)。

表 1 4 个北美冬青品种的半致死温度

Table 1 The semi-lethal temperatures(LT₅₀) with four varieties of *Ilex verticillata*

品种 varieties	Logistic 拟合方程 fitting curve equation of Logistic	半致死 温度/℃ LT ₅₀	R ²
‘Red Sprite’	$y=100/(1+1.642e^{0.019x})$	-26.4	0.952
‘Gray’	$y=100/(1+2.173e^{0.032x})$	-24.3	0.969
‘Oosterwijk’	$y=100/(1+1.692e^{0.018x})$	-29.2	0.976
‘Winter Gold’	$y=100/(1+2.140e^{0.038x})$	-20.0	0.945

2.3 低温胁迫对北美冬青可溶性糖、蛋白质、脯氨酸等渗透调节物质的影响

除‘Winter Gold’外,其他品种的可溶性糖含量均随着温度的降低呈先上升后下降的趋势,但出峰时间不一致,‘Red Sprite’可溶性糖含量的峰值出现在-7℃时,比对照增加了 68.3%;‘Gray’、‘Oosterwijk’的峰值出现在-17℃,比对照分别增加了 201.4%和 430.7%;‘Winter Gold’的峰值出现在-27℃,比对照增加了 116.9%。而在-27℃时‘Red Sprite’、‘Gry’、‘Oosterwijk’可溶性糖含量出现下降,品种‘Gray’、‘Oosterwijk’分别比-17℃时下降了 70.5%、67.5%($P<0.05$)(图 2A)。

随着温度的降低,除‘Oosterwijk’的可溶性蛋白含量不断增加外,其他品种的可溶性蛋白含量均呈先上升后下降趋势,都在-7℃达到高点后下降,但

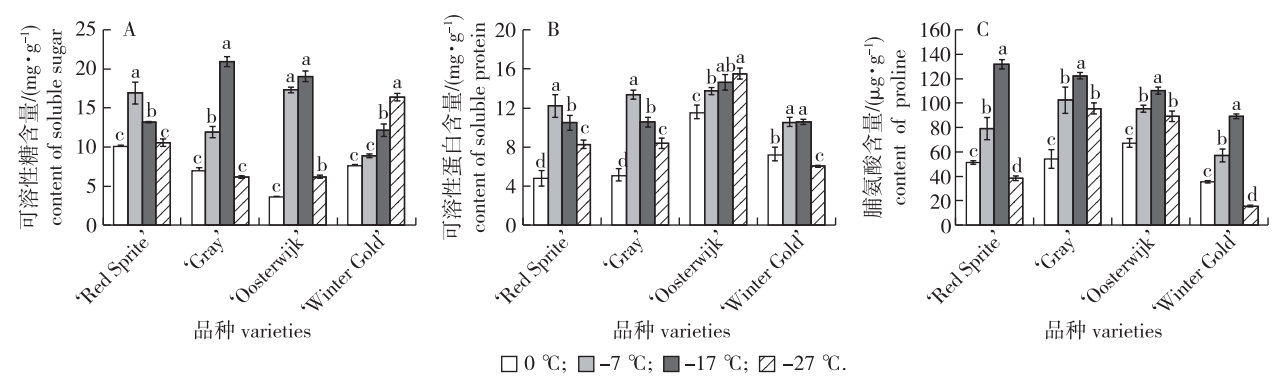


图2 低温胁迫处理对北美冬青可溶性糖、可溶性糖蛋白和脯氨酸含量的影响

Fig.2 Effects of low temperature stress on soluble sugar, soluble protein and proline content of four *I. verticillata* varieties

到-27 °C 时基本高于对照。在-7 °C 时, ‘Red Sprite’、‘Gray’ 和 ‘Winter Gold’ 3 个品种的可溶性蛋白含量分别比对照增加了 155.3%、165.4% 和 46.3% ($P<0.05$)。而 ‘Oosterwijk’ 的可溶性蛋白含量在-27 °C 达到高点,比对照增加了 34.6%。总的来看,温度降至-27 °C 时, ‘Oosterwijk’ 的可溶性蛋白含量远高于其他品种,最低的品种为 ‘Winter Gold’ (图 2B)。

在低温胁迫下,各品种的脯氨酸含量均呈先上升后下降的趋势,当温度降低至-17 °C 时, ‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’ 和 ‘Winter Gold’ 4 个品种的脯氨酸含量均达到最大值,分别比对照增加了 156.6%、125.7%、63.7% 和 151.3%。到-27 °C 时,品种 ‘Gray’、‘Oosterwijk’ 脯氨酸含量出现缓慢下降, ‘Red Sprite’、‘Winter Gold’ 大幅下降,甚至低于对照, ‘Red Sprite’ 比对照下降 25.6%, ‘Winter Gold’ 下降了 56.2% (图 2C)。

2.4 低温胁迫对北美冬青 SOD、POD 和 CAT 活性及 H_2O_2 含量的影响

随着处理温度的降低,4 个北美冬青品种 SOD 活性均呈先上升后下降的趋势。 ‘Red Sprite’、‘Oosterwijk’ 和 ‘Winter Gold’ 3 个品种 SOD 活性均在-17 °C 时达到最高值,分别比对照增加了 22.5%、44.1% 及 59.2% ($P<0.05$), SOD 活性上升幅度最大的品种为 ‘Winter Gold’; 而 ‘Gray’ 的 SOD 活性在-7 °C 时达到最大值,较对照增加了 21.8% ($P<0.05$)。4 个品种在-27 °C 时, SOD 活性都出现下降,品种 ‘Gray’ 和 ‘Oosterwijk’ 都下降至对照水平 ($P>0.05$), 而品种 ‘Red Sprite’ 和 ‘Winter Gold’ 的 SOD 活性仍显著高于对照,分别比对照提高了 14.9% 和 9.7% ($P<0.05$) (图 3A)。

POD 活性的变化趋势与 SOD 活性相似,也是呈先上升后下降趋势。整体来看 ‘Oosterwijk’ 和

‘Winter Gold’ POD 活性变化较为剧烈。品种 ‘Red Sprite’ 的 POD 活性只在-17 °C 小幅度增加 (6.9%), 其他温度处理与对照无显著性差异 ($P>0.05$); 品种 ‘Gray’ 温度为-7~ -17 °C 时 POD 变化没有显著差异,但比对照都显著地增加,在-17 °C 时比对照增加了 47.5%。而 ‘Oosterwijk’ 和 ‘Winter Gold’ 的 POD 活性均在-17 °C 时显著增加,分别比对照增加了 44.1%、276.7%, ‘Winter Gold’ 的增加幅度最为剧烈; 当温度降低至-27 °C 时,品种 ‘Red Sprite’ 与 ‘Oosterwijk’ 的 POD 活性都降至对照水平或不显著低于对照水平 ($P>0.05$), 而 ‘Winter Gold’ 的 SOD 活性仍比对照高 130.0%, 品种 ‘Gray’ 却比对照低了 27.5% (图 3B)。

CAT 活性的变化与 SOD 和 POD 活性变化不同,在轻度的低温胁迫下 (>-17 °C), 除了品种 ‘Gray’ 在-7 °C 时 CAT 活性显著提高外,其他 3 个品种出现降低趋势 (如 ‘Red Sprite’ 与 ‘Oosterwijk’), 或者变化不大 (‘Winter Gold’), 与对照没有明显差异。而在-27 °C 时,4 个品种的 CAT 活性出现急剧增加, ‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’ 和 ‘Winter Gold’ 4 个品种的 CAT 分别比对照增加了 80.0%、157.1%、61.5%、300%。 ‘Winter Gold’ 的 CAT 活性增加最明显 (图 3C)。

在低温处理过程中 4 个北美冬青品种的 H_2O_2 含量均呈先上升后下降的趋势,在-7 °C 时出现小幅增加,但在-17 °C 时出现剧烈地增加,其中品种 ‘Gray’ 的 H_2O_2 含量 (为对照的 12.5 倍) 增加值最高,其次为 ‘Oosterwijk’ (为对照的 10.2 倍)、 ‘Winter Gold’ (为对照的 7.0 倍), 品种 ‘Red Sprite’ (为对照的 4.8 倍) 增加幅度最小 ($P<0.05$)。当温度降到-27 °C 时,4 个品种 ‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’ 和 ‘Winter Gold’ 的 H_2O_2 含量均显著降低 ($P<0.05$), 分别比-17 °C 降低了 5.9%、79.7%、79.2% 和 76.8% (图 3D)。

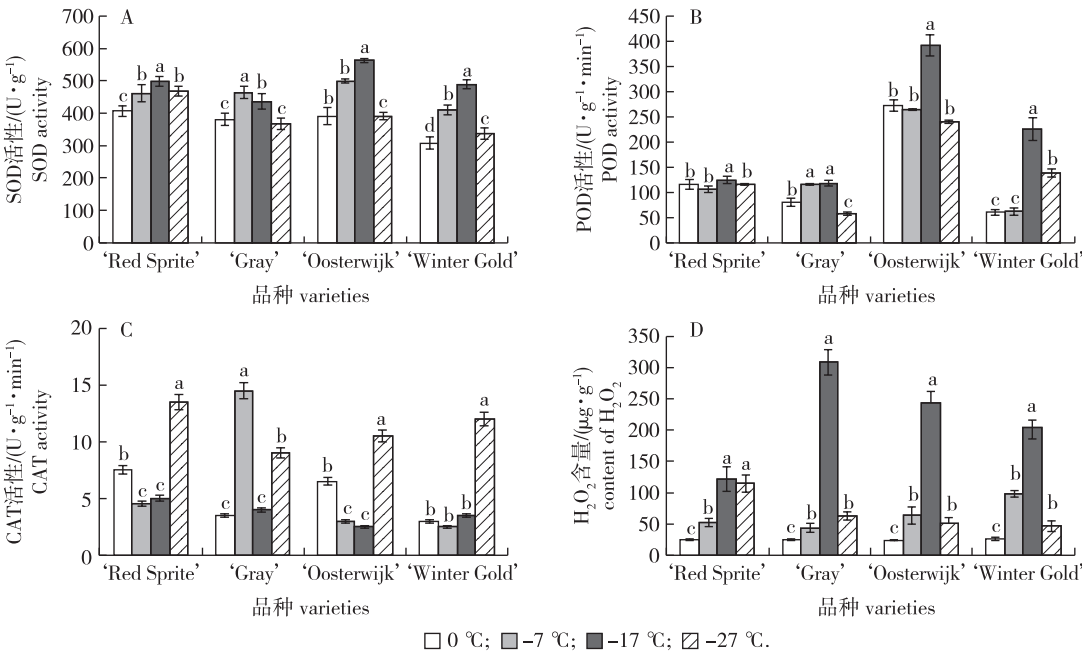


图3 低温胁迫处理对北美冬青 SOD、POD、CAT 活性及 H₂O₂ 含量的影响

Fig.3 Effects of low temperature stress on SOD, POD and CAT activities and H₂O₂ content of four *I. verticillata* varieties

2.5 4个北美冬青品种耐寒性综合评价

通过隶属函数法及权重法,结合4个落叶型冬青品种的细胞膜伤害程度指标[相对电导率(REC)和MDA含量]、活性氧物质H₂O₂含量、渗透调节物质[可溶性糖(SS)、可溶性蛋白(SP)和脯氨酸(Pro)含量]及抗氧化保护酶活性(SOD、POD、CAT)等9个指标变化,根据计算出的隶属函

数和权重,计算出各品种低温胁迫的综合评价,进行抗寒性的综合评价。由表2可看出,4个落叶型冬青的综合隶属函数平均值差异较大,4个品种的隶属函数值由大到小顺序为:‘Oosterwijk’、‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Winter Gold’,与半致死温度的结果相符,‘Red Sprite’与‘Gray’的隶属函数差值较小。

表2 4个落叶型冬青品种隶属函数值比较

品种 varieties	REC	MDA	H ₂ O ₂	SS	SP	Pro	SOD	POD	CAT	隶属函数平均值 appraisal average value
‘Red Sprite’	0.43	0.87	0.81	0.52	0.39	0.51	0.29	0.17	0.43	0.49
‘Gray’	0.46	0.76	0.70	0.46	0.42	0.67	0.20	0.10	0.44	0.47
‘Oosterwijk’	0.50	0.21	0.75	0.46	0.85	0.65	0.29	0.70	0.32	0.52
‘Winter Gold’	0.42	0.43	0.75	0.44	0.35	0.29	0.15	0.19	0.23	0.36

通过计算各指标的抗寒性系数,求平均值后可得出每个品种的耐寒性指数(D)。从表3中可以看出,综合评价价值最高的是‘Oosterwijk’品种,与隶属函数不同的是品种‘Gray’的综合评价指数高于

品种‘Red Sprite’,因此最终4个品种的耐寒能力由强到弱的顺序是:‘Oosterwijk’、‘Gray’、‘Red Sprite’、‘Winter Gold’。

表3 4个落叶型冬青品种抗寒性综合评价

品种 varieties	抗寒性指数(D) cold resistance index									综合评价价值 comprehensive assessment
	REC	MDA	H ₂ O ₂	SS	SP	Pro	SOD	POD	CAT	
‘Red Sprite’	0.034	0.049	0.129	0.038	0.039	0.051	0.010	0.037	0.076	0.549
‘Gray’	0.039	0.020	0.211	0.067	0.040	0.051	0.005	0.008	0.077	0.605
‘Oosterwijk’	0.013	0.020	0.065	0.097	0.117	0.016	0.011	0.025	0.110	0.665
‘Winter Gold’	0.036	0.017	0.146	0.036	0.022	0.042	0.007	0.028	0.045	0.461

3 讨论

研究表明植物在低温胁迫下,其细胞膜透性变大,使细胞内的电解质大量外渗,因此相对电导率可以代表植物细胞膜受伤害的程度,是检测植物耐寒性较为快速和准确的指标^[13]。前人通过对6种常绿冬青属植物的抗寒性比较,表明电导率与 Logistic 方程结合的方法能够较简便地筛选出抗性较强的品种^[14]。本研究也表明,随着处理低温胁迫强度的加强,4个北美冬青品种的相对电导率均呈上升趋势,总体呈“S”曲线增长,这与梁锁兴等^[10]和陈洁等^[14]对7个杂种榛品种和3种含笑属植物在低温胁迫下其相对电导率变化趋势的研究结果一致。本研究中当温度降低至-27℃时,‘Winter Gold’的相对电导率最大,说明该品种抗寒性差一些,这与计算出的半致死温度(LT₅₀)结果一致。从‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Oosterwijk’和‘Winter Gold’4个品种的LT₅₀结果看出,半致死温度均在-20℃至-30℃范围内,都属于比较抗寒的树种,其抗寒性由强到弱顺序为:‘Oosterwijk’、‘Red Sprite’、‘Gray’、‘Winter Gold’。

低温胁迫会破坏植物的膜系统,造成膜脂过氧化现象,其生成产物MDA的含量高低可用来衡量植物受到的伤害程度^[15]。本研究表明,随着处理温度的降低,4个落叶型冬青品种的MDA含量均有不同程度增加,在处理温度为-27℃时达到最大值,表明此温度对各品种均造成严重胁迫,导致植物体内MDA含量的增加,其中‘Oosterwijk’的MDA含量增加幅度最小,表明该品种抗寒性较好,而‘Winter Gold’的MDA含量增加幅度最大,表明该品种抗寒性较差,这与池敏杰等^[16]对不同番荔枝的抗寒性研究结果相似。

可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸是逆境胁迫下主要的渗透调节物质,低温胁迫下植物体内的可溶性糖、可溶性蛋白及脯氨酸含量会出现增加,以此提高细胞液的浓度,降低细胞冰点,对植物起渗透调节作用,与植物的抗寒性呈正相关^[15,17],低温处理能够增加紫花苜蓿可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸的积累从而提高其抗寒能力^[18]。本研究表明,随着温度的降低,4个落叶型冬青品种的可溶性糖含量和脯氨酸含量均呈先上升后下降趋势,除‘Oosterwijk’的可溶性蛋白含量随着温度降低而不断增加外,其他品种的可溶性蛋白含量随着温度的降低均呈先上升后下降趋势。这些结果在油棕^[19]、常绿阔叶植物^[20]、酢浆草属植物^[21]、橡

胶^[22]和番荔枝^[23]等植物的抗寒性研究中都有相似的结果,说明渗透调节物质(特别是脯氨酸和可溶性糖)在逆境情况下可以稳定细胞膜结构,提高渗透作用和保水能力,增强抗逆性^[18,24]。

过氧化氢(H₂O₂)超氧阴离子(O₂⁻)是逆境情况产生的活性氧(ROS)物质,低温情况下,植物会增加细胞内活性氧物质的含量^[25]。SOD和POD是植物细胞的抗氧化保护酶,能够有效地清除植物细胞内积累的活性氧^[26-27]。本研究中,随着处理温度的降低,4个落叶型冬青品种的H₂O₂含量均呈先上升后下降的趋势,当温度降低至-17℃时达到最大值,说明4个品种均在此温度时由于过氧化氢激增,产生氧化胁迫。但随着温度的降低4个品种的SOD和POD活性也是在-17℃达到最高,与过氧化氢的变化趋势一致,说明此时抗氧化酶与活性氧水平处于动态平衡中,抗氧化酶能够清除过量的过氧化氢。到-27℃时SOD和POD酶活性虽出现下降,但此时各品种的CAT酶活性急剧增加,仍能清除过量的过氧化氢而使北美冬青受到较低的氧化胁迫,产生较强的抗寒性,因而过氧化氢水平也出现显著下降,说明3种酶对活性氧的清除存在温度效应,前两者在温度稍高的情况下首先清除过氧化氢,后者在温度较低情况下活性较强。

采用隶属函数法评价植物的抗寒性具有一定的科学性和准确性^[11]。曹阳等^[20]对不同常绿阔叶植物叶片抗寒性比较,以及方仁等^[23]对不同番荔枝品种在自然低温条件下的抗寒性比较等研究结果都采用了隶属函数法来进行评价。从本研究结果可以看出,尽管半致死温度(只通过相对电导率)和隶属函数对4个品种的耐寒性比较结果相一致,但经过权重和隶属函数乘积的综合评价更能代表实际的结果,因此4个品种的综合抗寒能力由强到弱的顺序是:‘Oosterwijk’、‘Gray’、‘Red Sprite’、‘Winter Gold’。本研究结果可为北美冬青的北移及引种适应性提供参考和指导。

参考文献(reference):

- [1] 余有祥,周正宝,徐旻昱,等.‘奥斯特’北美冬青繁育技术[J].中国花卉园艺,2012(14):32-35. YU Y X, ZHOU Z B, XU M Y, et al. Breeding technology of *Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’ [J]. China Flowers Hortic, 2012(14):32-35.
- [2] 陈茜,周之涵,王瑞琪,等.低温处理对北美冬青叶片的抗氧化能力的影响[J].热带亚热带植物学报,2016,24(6):689-695. CHEN X, ZHOU Z H, WANG R Q, et al. Effect of low temperature stress on antioxidant ability in *Ilex verticillata* leaves [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2016, 24(6):689-695. 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.06.013.
- [3] 王伟丽,何立平,余敏芬,等.12个北美冬青品种的ISSR亲缘

- 关系分析[J].浙江农林大学学报,2018,35(4):612-617. WANG W L, HE L P, YU M F, et al. Phylogenetic relationships among 12 cultivars of *Ilex verticillata* based on ISSR molecular markers[J]. J Zhejiang A F Univ, 2018, 35(4): 612-617.
- [4] 查琳,袁紫倩,董建华,等.‘奥斯特’北美冬青在我国区域性引种试验[J].林业科技开发,2015,29(6):80-82. ZHA L, YUAN Z Q, DONG J H, et al. Regional introduction experiment of *Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’[J]. China For Sci Technol, 2015, 29(6): 80-82. DOI: 10.13360/j.issn.1000-8101.2015.06.020.
- [5] 姚丽娟,周秀兰,杨燕萍,等.温州地区北美冬青栽培适应性观察[J].农业科技通讯,2016(1):223-224. YAO L J, ZHOU X L, YANG Y P, et al. Adaptability of cultivation of *Ilex verticillata* in Wenzhou area[J]. Bull Agric Sci Tech, 2016(1): 223-224.
- [6] 吴自光,孙新新,翟光耀,等.临沂地区北美冬青引种适应性研究[J].现代农业科技,2017(16):124-125. WU Z G, SUN X X, ZHAI G Y, et al. Study on the adaptability of introduction of *Ilex verticillata* in Linyi area[J]. Mod Agric Sic Technol, 2017(16): 124-125.
- [7] 李鸿杰,雷颖.甘肃南部北美冬青引种适应性试验研究[J].林业科技通讯,2019(1):39-42. LI H J, LEI Y. Study on introduction experiment of *Ilex verticillata* in south of Gansu Province[J]. For Sci Technol, 2019(1): 39-42. DOI: 10.13456/j.cnki.lykt.2018.10.10.0008.
- [8] 张小莉,王鹏程,宋纯鹏.植物细胞过氧化氢的测定方法[J].植物学报,2009,44(1):103-106. ZHANG X L, WANG P C, SONG C P. Methods of detecting hydrogen peroxide in plant cells[J]. Chin Bull Bot, 2009, 44(1): 103-106.
- [9] 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. LI H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [10] 梁锁兴,席海源,王文平,等.电解质渗出率配合 Logistic 方程鉴定 7 个平欧杂种榛品种(系)的抗寒性[J].农学学报,2017,7(4):34-38. LIANG S X, XI H Y, WANG W P, et al. Determination of cold-resistance for 7 flat-European hazel cultivars through electrical permeation rate combining Logistic equation[J]. J Agric, 2017, 7(4): 34-38.
- [11] 王国霞,王会鱼,李春阁,等.取样部位、时间对植物高温半致死温度的影响[J].福建林业科技,2019,46(1):45-51. WANG G X, WANG H Y, LI C G, et al. Analysis of the influence of sampling site and time on the determination of semilethal high temperature of plants[J]. J Fujian For Sci Technol, 2019, 46(1): 45-51. DOI: 10.13428/j.cnki.fjlk.2019.01.010.
- [12] 刘旭梅,赵冰,申惠翡,等.低温胁迫下二十个杜鹃花品种的抗寒性评价[J].北方园艺,2017(5):60-66. LIU X M, ZHAO B, SHEN H F, et al. Comprehensive evaluation of cold resistance of twenty *Rhododendron* cultivars under cold stress[J]. North Hortic, 2017(5): 60-66. DOI: 10.11937/bfyf.201705015.
- [13] MACHADO R D, CHRISTOFF A P, LOSS-MORAIS G, et al. Comprehensive selection of reference genes for quantitative gene expression analysis during seed development in *Brassica napus* [J]. Plant Cell Rep, 2015, 34(7): 1139-1149. DOI: 10.1007/s00299-015-1773-1.
- [14] 陈洁,金晓玲,宁阳,等.3 种含笑属植物抗寒生理指标的筛选及评价[J].河南农业科学,2016,45(2):113-118. CHEN J, JIN X L, NING Y, et al. Identification and comprehensive evaluation of cold resistance indexes of three *Michelia* plants[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2016, 45(2): 113-118. DOI: 10.15933/j.cnki.10043268.
- [15] LIU Y S, GENG J C, SHA X Y, et al. Effect of *Rhizobium* symbiosis on low-temperature tolerance and antioxidant response in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 538. DOI: 10.3389/fpls.2019.00538.
- [16] 池敏杰,刘育梅.3 种番荔枝属植物对低温胁迫的生理响应及抗寒性评价[J].2019,48(4):339-342. CHI M J, LIU Y M. Physiological response and cold resistance evaluation of three species of *Annona* to low temperature stress[J]. Subtropical Plant Science, 2019, 48(4): 339-342. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7791.2019.04.006.
- [17] CAO S F, CAI Y T, YANG Z F, et al. MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and γ -aminobutyric acid contents[J]. Food Chem, 2012, 133(4): 1466-1470. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.035.
- [18] BAO G Z, AO Q, LI Q Q, et al. Physiological characteristics of *Medicago sativa* L. in response to acid deposition and freeze-thaw stress[J]. Water Air Soil Pollut, 2017, 228(9): 376. DOI: 10.1007/s11270-017-3561-8.
- [19] 刘艳菊,周丽霞,曹红星.低温胁迫下不同浓度 ABA 对 4 个油棕新品种幼苗生理特性的影响[J].热带作物学报,2020,41(6):1124-1131. LIU Y J, ZHOU L X, CAO H X. Effects of exogenous ABA on physiology of 4 oil Palm new varieties under cold stress[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(6): 1124-1131.
- [20] 曹阳,张旭艳.4 种常绿阔叶植物叶片抗寒性研究[J].山西农业科学,2019,47(3):334-336. CAO Y, ZHANG X Y. Study on cold resistance of four evergreen broad-leaved plant leaves[J]. J Shanxi Agric Sci, 2019, 47(3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2481.2019.03.10.
- [21] 李文明,魏一粟,钱燕萍,等.5 种酢浆草属植物对低温胁迫的生理响应及抗寒性评价[J].东北林业大学学报,2017,45(7):28-33. LI W M, WEI Y S, QIAN Y P, et al. Evaluation of cold resistance and physiological response to low temperature on five kinds of *Oxalis* plants[J]. J Northeast For Univ, 2017, 45(7): 28-33. DOI: 10.13759/j.cnki.dlxb.2017.07.006.
- [22] 原慧芳,谢江,周会平,等.不同橡胶树品种耐寒性指标比较及综合评价[J].植物资源与环境学报,2018,27(4):72-80. YUAN H F, XIE J, ZHOU H P, et al. Comparison on cold tolerance indexes of different cultivars of *Hevea brasiliensis* and comprehensive evaluation[J]. J Plant Resour Environ, 2018, 27(4): 72-80. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.04.08.
- [23] 方仁,安振宇,黄伟雄,等.6 个番荔枝品种在自然低温条件下的抗寒性比较[J].江苏农业科学,2017,45(7):136-138. FANG R, AN Z Y, HUANG W X, et al. Comparison of cold resistance of 6 *cherimoya* cultivars under natural low temperature[J]. Jiangsu Agric Sci, 2017, 45(7): 136-138. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.036.
- [24] STEINDAL A L H, RØDVEN R, HANSEN E, et al. Effects of photoperiod, growth temperature and cold acclimatisation on glucosinolates, sugars and fatty acids in kale[J]. Food Chem, 2015, 174: 44-51. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.129.
- [25] AIRAKI M, LETERRIER M, MATEOS R M, et al. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress[J]. Plant Cell Environ, 2012, 35(2): 281-295. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02310.x.
- [26] CLEMENTE-MORENO M J, OMRANIAN N, SÁEZ P L, et al. Low-temperature tolerance of the Antarctic species *Deschampsia antarctica*: a complex metabolic response associated with nutrient remobilization[J]. Plant Cell Environ, 2020, 13737: 1-18. DOI: 10.1111/pcel.13737.
- [27] DHARSHINI S, HOANG N V, MAHADEVAIAH C, et al. Root transcriptome analysis of *Saccharum spontaneum* uncovers key genes and pathways in response to low-temperature stress[J]. Environ Exp Bot, 2020, 171: 103935. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.103935.