

文章编号: 1674-7054(2013)02-0119-05

海南胡椒属植物抗寒性评价

王 蓉^{1,2}, 刘进平¹, 赵慧琴³(1. 海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学 农学院 海南 海口 570228;
2. 南京大学 生命科学院 江苏 南京 210009; 3. 晋城市气象局 山西 晋城 048400)

摘 要: 对 10 种海南胡椒属植物叶片进行 -3 , -5 , -7 °C 低温处理后, 采用电导仪法和硫代巴比妥酸法, 分别测定低温胁迫对海南胡椒属植物叶片的相对电导率和丙二醛含量的影响, 同时对其抗寒性进行评价。结果表明: 菱叶、山菱、大叶蒟、复毛胡椒抗寒性较强, 而大叶种胡椒和海南蒟的抗寒能力较弱。

关键词: 胡椒属; 抗寒性; 相对电导率; 丙二醛; 海南

中图分类号: S 573.9

文献标志码: A

胡椒属 (*Piper*) 是胡椒科的一个大属, 大多数植物为攀援状亚灌木或木质藤本植物, 海南胡椒属约有 10 个种, 除栽培胡椒 (*Piper nigrum* L.) 外, 其余为野生种^[1-3]。栽培胡椒是重要的热带香辛植物, 具有很高的经济价值, 野生胡椒资源也具有重要的开发价值。由于胡椒栽培品种比较单一, 制约着我国胡椒产业的发展, 因此, 目前胡椒选育的首要任务就是对胡椒属植物种质资源进行调查和鉴定^[4-5]。低温是胡椒属植物重要的环境胁迫因素, 对胡椒生长发育影响很大, 严重时甚至会导致胡椒植株死亡。由于田间鉴定胡椒属植物抗寒性受地域和年气候限制, 有一定的局限性, 且易损害被测植株。常规室内植物抗寒性测定是一种比较简便、快速、灵敏的方法, 而相对电导率和丙二醛含量测定法能互补, 准确地反映植物的抗寒性, 已被广泛应用于多种植物的抗寒性鉴定^[6-19]。笔者采用相对电导率和丙二醛含量测定法对海南胡椒属植物的抗寒性进行测定, 旨在将抗寒性种质应用于胡椒品种选育。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为海南大学儋州校区农学院苗圃保存的大叶蒟 (*Piper laetispicum*)、假山蒟 (*P. curtipedunculatum*)、华南胡椒 (*P. austrosinense*)、海南蒟 (*P. hainanense*)、复毛胡椒 (*P. bonii*)、毛蒟 (*P. puberulum*)、大叶种胡椒 (*P. nigrum* “Lampong Type”)、山菱 (*P. sarmentosum*)、菱叶 (*P. betle*) 和芒叶蒟 (*P. boehmeriaefolium*) 等胡椒属种质。参试植株生长健壮、长势一致、无病虫害。

1.2 材料处理 取海南胡椒属试验样本植株第 2~4 片叶, 迅速装入保鲜袋中带回实验室, 用自来水冲洗干净, 再用去离子水漂洗 3 次, 在滤纸上吸干。将叶片分成 A1, A2, A3 共 3 份, 每份约 10 g, 分别放入小烧杯, 置于可调冰箱中, 分别以 -3 , -5 , -7 °C 的梯度逐渐降温, 低温处理后去除中脉及叶缘部分, 用于测定各项生理指标。

1.3 细胞膜透性的测定 采用电导仪法, 用相对电导率估算细胞膜透性^[20]。取经低温胁迫处理的海南胡椒属植物叶片, 剪去主叶脉和叶的边缘, 用打孔器将其打成直径为 1 cm 的小叶圆块, 共 2 g。每个种质各取 1 份 1 g 的小叶圆块, 分别放入已加入 25 mL 蒸馏水的 100 mL 三角瓶中, 分别用于非煮沸和煮沸提取。非煮沸的三角瓶塞上橡皮塞, 放入 25 °C 恒温水浴锅中浸取; 煮沸的三角瓶放入沸水浴中煮 10 min, 然

收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060204)

作者简介: 王蓉 (1988-), 女, 江西九江人, 南京大学生命科学院 2012 级硕士研究生。

通信作者: 刘进平 (1970-), 男, 山西沁县人, 海南大学农学院教授, 博士, 研究方向: 植物分子遗传学和植物组织培养, E-mail: liu3305602@163.com

后取出三角瓶,稍冷却后即加上塞,放入 25 ℃ 恒温水浴中浸取 16 h。用 DDSJ-308A 型雷磁电导率仪测定各电导率。按照以下公式计算相对电导率:

$$\text{相对电导率} = (\text{非煮沸电导率} / \text{煮沸电导率}) \times 100\%$$

1.4 丙二醛含量的测定 采用硫代巴比妥酸法^[21]测定丙二醛的含量。称取经低温胁迫处理的海南胡椒属植物叶片 1 g,加入少量石英砂和 $\varphi = 10\%$ 的三氯乙酸 2 mL,研磨成匀浆,再加 8 mL $\varphi = 10\%$ 的三氯乙酸进一步研磨,匀浆以 $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液(丙二醛提取液)。取 4 支干净试管编号,其中 1 支为对照,3 支为样品管(3 次重复),各加入提取液 2 mL,以蒸馏水为对照,然后各管再加入 2 mL $\varphi = 0.6\%$ 的硫代巴比妥酸溶液。摇匀,混合液在沸水浴中反应 15 min,迅速冷却后再离心。取上清液分别在 532、600、450 nm 波长下用 2100 型紫外/可见分光光度计测定吸光度(A)值。按照以下公式计算丙二醛浓度:

$$C_{\text{MDA}} = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$$

式中 C_{MDA} 是反应混合液中 MDA 的浓度,单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; A_{532} 、 A_{600} 、 A_{450} 分别为 532、600、450 nm 波长下测得的吸光度值。

提取液中 MDA 浓度按下式计算:

$$\text{提取液中 MDA 浓度} (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = C_{\text{MDA}} \times \text{反应液体积} (\text{mL}) / \text{测定时提取液用量} (\text{mL})$$

样品中 MDA 含量按下式计算:

$$\text{样品中 MDA 含量} (\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{提取液中 MDA 浓度} (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{提取液总量} (\text{mL}) / \text{植物组织鲜质量} (\text{g})$$

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对海南胡椒属植物叶片膜相对透性的影响 由图 1 可知,在低温胁迫过程中,10 种海南胡椒属植物的膜相对透性均受到不同程度的影响,总体表现为随着温度的降低,各个种叶片的相对电导率都呈升高趋势,说明低温处理后胡椒植株细胞膜受损程度逐渐加大,而不同种的相对电导率变化趋势并不一致。由表 1 可以看出,在 $-3 \sim -5$ ℃ 处理温度范围内,大叶种胡椒和海南茛相对电导率变化幅度最大,分别上升 114.04% 和 113.85%;华南胡椒和假山茛的相对电导率变化幅度较大,分别为 65.38% 和 64.40%;复毛胡椒和毛茛次之,分别为 62.42% 和 59.24%;而萎叶的相对电导率变化幅度最小,电导率变化幅度,为 12.47%。而在 $-5 \sim -7$ ℃ 处理温度范围内,相对电导率增加幅度最大的是山茛,为 53.48%;增加幅度最小的是萎叶,为 22.18%。

表 1 不同温度处理间海南胡椒属植物叶片相对电导率变化幅度

Tab. 1 Variation in relative conductivity of leaves *Piper* plants in Hainan treated with different temperatures

种 Species	-3 ~ -5 ℃ 相对电导率 变化幅度 / % Relative conductivity variation from -3 ℃ to -5 ℃	-5 ~ -7 ℃ 相对电导率 变化幅度 / % Relative conductivity variation from -5 ℃ to -7 ℃	相对电导率变化 幅度 / % Relative conductivity variation
大叶茛 (<i>Piper laetispicum</i>)	25.86	42.47	7.008
假山茛 (<i>P. curtipedunculum</i>)	64.40	27.63	9.653
华南胡椒 (<i>P. austrosinense</i>)	65.38	31.02	7.813
海南茛 (<i>P. hainanense</i>)	113.85	46.78	15.047
复毛胡椒 (<i>P. bonii</i>)	62.42	25.35	4.329
毛茛 (<i>P. puberulum</i>)	59.25	34.43	10.461
大叶种胡椒 (<i>P. nigrum</i> "Lampong Type")	114.04	40.57	12.157
山茛 (<i>P. sarmentosum</i>)	32.91	53.48	8.141
萎叶 (<i>P. betle</i>)	12.47	22.18	3.011
芭叶茛 (<i>P. boehmeriaefolium</i>)	32.49	48.94	7.288

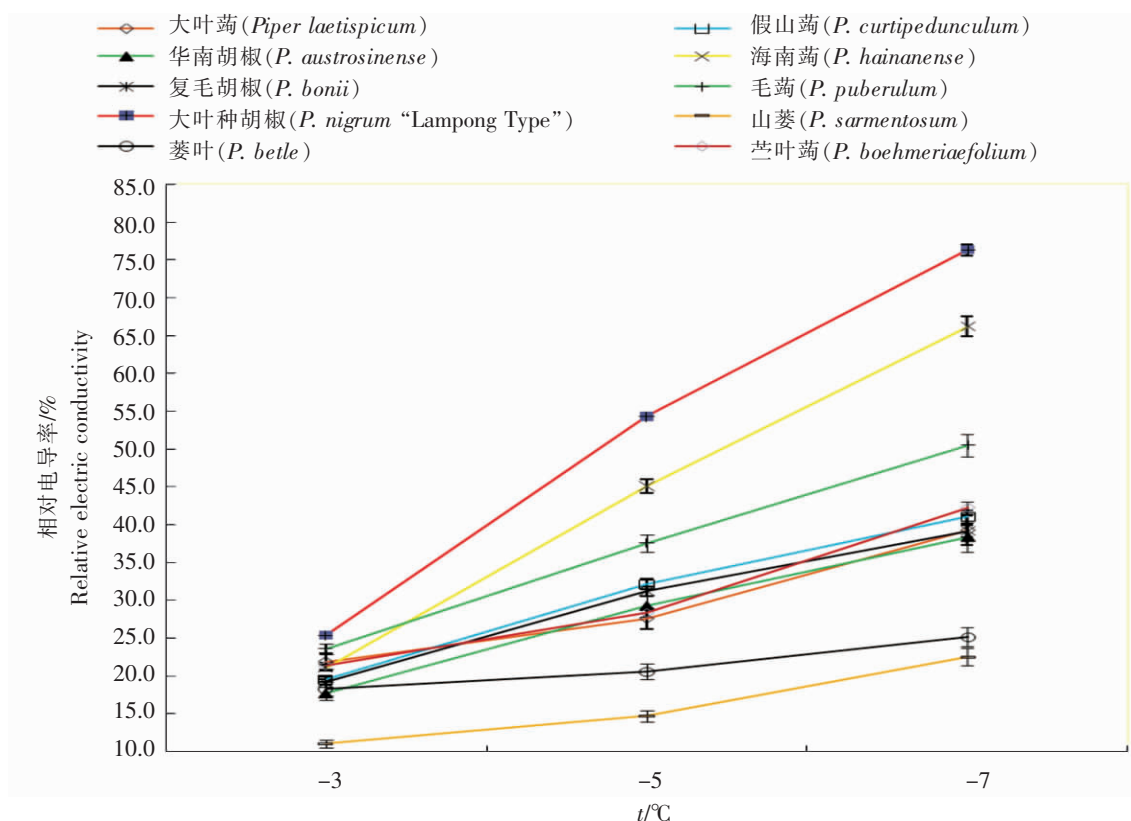


图 1 低温胁迫对海南胡椒属植物叶片相对电导率的影响

Fig. 1 Effect of low-temperature stress on the relative electric conductivity of leaves *Piper* plants in Hainan

2.2 低温胁迫对海南胡椒属植物叶片丙二醛 (MDA) 含量的影响 由图 2 可以看出,海南胡椒属植物不同种的叶片经低温胁迫处理后,叶片内的 MDA 含量变化呈现不同程度增加,趋势与相对电导率变化基本相同。由表 2 可以看出,在 $-3 \sim -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的范围内,山蒟和菱叶的丙二醛含量增加不大,分别为 $0.693\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.165\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;海南蒟与华南胡椒的丙二醛含量增加较大,分别为 $6.283\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.682\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在 $-5 \sim -7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的范围内,华南胡椒和菱叶增加量较小,分别为 $1.459\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.846\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;海南蒟和大叶种胡椒增加量较大,分别为 $8.764\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $8.056\text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果表明,大叶种胡椒和海南蒟丙二醛含量增加较多,而菱叶、山蒟、大叶蒟、复毛胡椒增加较少。

表 2 不同温度处理海南胡椒属植物叶片丙二醛 (MDA) 含量的变化

Tab. 2 Increase in malondialdehyde (MDA) content of leaves *Piper* plants in Hainan treated with different temperatures

种 Species	$-3 \sim -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内 MDA 含量的增加/($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) MDA content increase from $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-5 \sim -7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内 MDA 含量的增加/($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) MDA content increase from $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$	MDA 含量的增加/ ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) MDA content increase
大叶蒟 (<i>Piper laetispicum</i>)	4.131	2.877	17.36
假山蒟 (<i>P. curtipedunculum</i>)	5.323	4.33	21.47
华南胡椒 (<i>P. austrosinense</i>)	5.682	2.131	20.63
海南蒟 (<i>P. hainanense</i>)	6.283	8.764	45.11
复毛胡椒 (<i>P. bonii</i>)	2.87	1.459	19.9
毛蒟 (<i>P. puberulum</i>)	5.481	4.98	26.9
大叶种胡椒 (<i>P. nigrum</i> "Lamong Type")	4.101	8.056	50.94
山蒟 (<i>P. sarmentosum</i>)	0.693	7.448	11.47
菱叶 (<i>P. betle</i>)	1.165	1.846	6.84
茛叶蒟 (<i>P. boehmeriaefolium</i>)	3.002	4.286	20.82

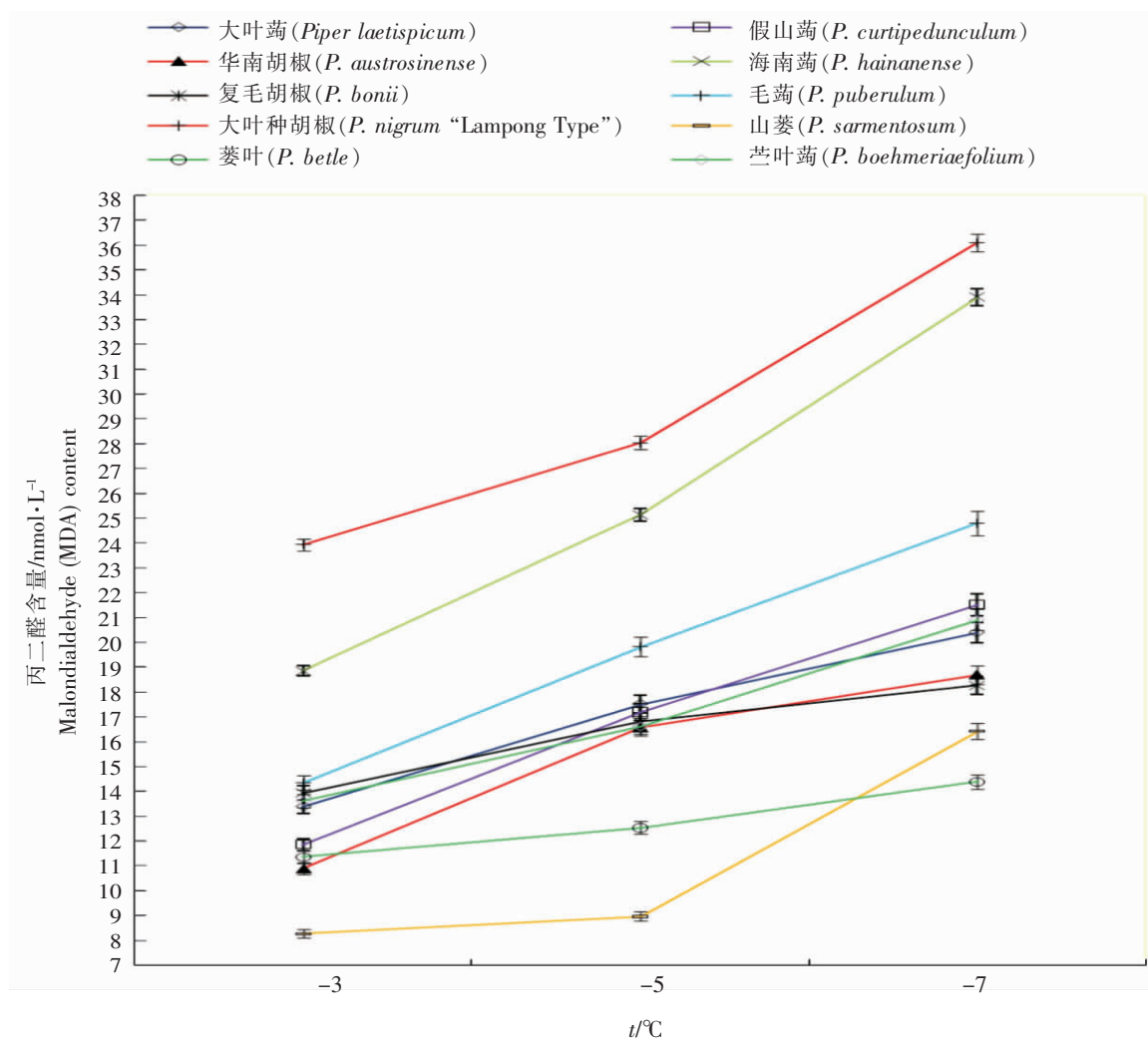


图2 低温胁迫对海南胡椒属植物叶片丙二醛(MDA)含量的影响

Fig. 2 Effect of low-temperature stress on the malondialdehyde (MDA) content of leaves *Piper* plants in Hainan

3 讨论

由于细胞膜作为细胞与环境之间的界面,包括低温在内的各种逆境对细胞的影响首先作用于细胞膜,而逆境胁迫对细胞膜的影响通常表现细胞膜透性发生不同程度增大,电解质和某些小分子有机物质大量渗漏,从而引起相对电导率的变化。抗寒性较强的种或品种细胞膜损伤程度小,其透性增加较慢,且透性的变化可以逆转,易恢复正常;而抗寒性差的种或品种膜透性增加较快,且不易恢复正常,严重时甚至造成死亡。也就是说,电导率升高越多,抗寒性越弱^[22-23]。丙二醛(MDA)作为植物细胞膜脂过氧化产物之一,具有细胞毒性,能与细胞内各种成分发生反应,从而引起酶和膜的损伤,对质膜有毒害作用。植物在遇低温等逆境伤害时,丙二醛含量增加。低温下植物生成丙二醛越多,说明其受伤害程度越大,因此,丙二醛的含量高低,已成为植物抗寒反应的一个重要生理指标^[16, 18-19]。许多研究者利用相对电导率变化等植物抗寒性生理指标,成功地验证和测定了植物种或品种、砧木等材料的抗寒性^[6-19]。本研究中,随着温度的降低,各海南胡椒属植物叶片的相对电导率和丙二醛含量呈上升趋势,说明低温对其造成了伤害,而且随着温度的降低,受害越严重。本研究结果表明,菱叶、山蒟、大叶蒟、复毛胡椒抗寒性较强,而大叶种胡椒和海南蒟的抗寒能力较弱。这些结果对于海南胡椒属不同植物的性状评价和将抗寒性材料应用于胡椒育种均具有重要的参考价值。

参考文献:

- [1]陈焕镛. 海南植物志·第1卷[M]. 北京:科学出版社,1964:330-338.
- [2]郑维全. 海南野生胡椒种质资源及利用[J]. 广西热作科技,1999,73(4):12-13,35.
- [3]刘进平. 海南野生胡椒资源的开发利用[J]. 中国热带农业,2010,7(2):35-36.
- [4]刘进平. 建立胡椒科生产体系 重点研究胡椒生物技术[C]//中国热带作物学会. 中国热带作物学会第七次全国会员代表大会论文集. 海口:中国热带作物学会,2004:234-237.
- [5]刘进平,郑成木. 胡椒育种的理论与实践[J]. 热带农业科技,2003,26(1):32-33.
- [6]任庆棉. 几种野生苹果属植物抗寒性能力的鉴定[J]. 北方果树,1988,11(4):23-25.
- [7]高爱农. 苹果品种抗寒性测定方法的研究[J]. 果树科学,2000,17(10):17-21.
- [8]李俊才,刘成,王家珍,等. 电导法测定梨主栽品种抗寒性试验[J]. 中国果树,2008(1):23-26.
- [9]罗正荣,舒晓东,李春初,等. 柑橘抗寒性鉴定技术规范研究[J]. 果树科学,1992,9(4):203-207.
- [10]石雪晖,刘昆玉,杨国顺,等. 低温胁迫对柑桔离体叶片质膜透性和MDA及维生素C含量的影响[J]. 湖南农业大学学报,1997,23(1):36-40.
- [11]邓令毅,王洪春. 葡萄的抗寒性与质膜透性[J]. 植物生理学通讯,1984,20(2):12-16.
- [12]JALILI R. Studies on frost resistance of some grapevine cultivars[J]. Agriculture Science,1998,34(7):161-173.
- [13]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.
- [14]王飞,陈登文,李嘉瑞,等. 杏花及幼果的抗寒性研究[J]. 西北植物学报,1995,15(2):133-137.
- [15]王飞,陈登文,高爱琴,等. 杏品种一年生休眠枝、花、幼果抗寒的相关分析[J]. 西北植物学报,1999,19(4):618-622.
- [16]陈新华,郭宝林,赵静,等. 休眠期内甜樱桃不同品种枝条的抗寒性[J]. 河北农业大学学报,2009,32(6):37-40.
- [17]万清林. 草莓抗寒特性分析[J]. 北方园艺,1990,24(8):4-7.
- [18]段肖翠,倪志云,路丙社,等. 低温胁迫对阿月浑子抗寒生理指标的影响[J]. 河北农业大学学报,2005,28(4):48-50.
- [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.
- [20]白宝璋. 植物生理学测试技术[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993.
- [21]陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002.
- [22]LYONS J M. Chilling injury in plants[J]. Ann. Rev. Plant Physical,1973,24(6):445-446.
- [23]陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害[J]. 植物生理学通讯,1991,27(2):84-90.

Evaluation of Cold Resistance of *Piper* Plants in Hainan

WANG Rong^{1,2}, LIU Jinping¹, ZHAO Huiqin³

(1. Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources (Hainan University), Ministry of Education; College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210009, China; 3. Jincheng Bureau of Meteorology, Jincheng 048400, China)

Abstract: In order to evaluate cold resistance of *Piper* plants in Hainan, relative conductance percentages and malondialdehyde contents of 10 germplasms of *Piper* plants after treatments of their leaves with low temperature of -3°C , -5°C , -7°C were measured. Based on the relationship between the relative conductivity and malondialdehyde (MDA) content with the cold resistance, of 10 species of *Piper* in Hainan, the cold resistance of *P. betle*, *P. sarmentosum*, *P. laetispicum*, and *P. bonii* are comparatively strong, and that of *P. nigrum* "Lam-pong Type" and *P. hainanense* are weaker.

Keywords: *Piper*; cold resistance; relative electrical conductivity; malondialdehyde; Hainan