



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113079998 A

(43) 申请公布日 2021.07.09

(21) 申请号 202110498064.9

(22) 申请日 2021.05.08

(71) 申请人 四川农业大学

地址 610000 四川省成都市温江区惠民路  
211号

(72) 发明人 马均 何业华 钟小兰 薛彦斌  
周徐子鑫 毛美琴 杨威

(74) 专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理  
事务所(普通合伙) 51264

代理人 韩晓银

(51) Int.Cl.

A01G 22/60 (2018.01)

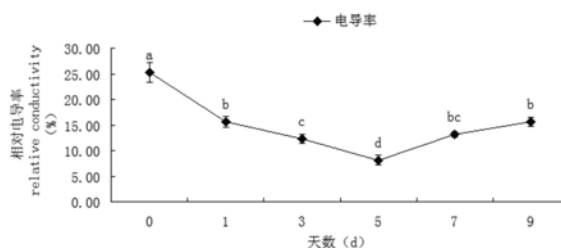
权利要求书1页 说明书13页 附图8页

### (54) 发明名称

一种提高红苞凤梨抗寒性的方法

### (57) 摘要

本发明提供一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,属于植物栽培领域。该方法包括以下步骤:步骤1,将红苞凤梨组培苗接种到含有低温处理剂的MS培养基培养;步骤2,培养完成后,再进行低温锻炼处理。采用本发明处理后的红苞凤梨,可以提高其体内的保护酶系统(SOD、POD、CAT)活性,来减轻低温胁迫对红苞凤梨的伤害,使叶片结构保持完整性,缓解了叶绿素降解,促进了光合作用,从而提高了红苞凤梨的整体抗寒性。



1. 一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:包括以下步骤:  
步骤1,将红苞凤梨组培苗接种到含有低温处理剂的MS培养基培养;  
步骤2,培养完成后,再进行低温锻炼处理。
2. 根据权利要求1所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:所述红苞凤梨组培苗高度为3~4cm,具有3-5条根和5-8片叶。
3. 根据权利要求1所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:当采用ABA为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:ABA浓度为1~12mg/L,培养温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为10~40d。
4. 根据权利要求1或3所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:当采用ABA为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:ABA浓度为8mg/L,培养温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为30d。
5. 根据权利要求1所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:当采用SA为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:SA浓度为1~5mg/L,培养温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为10~40d。
6. 根据权利要求1或5所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:当采用SA为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:SA浓度为5mg/L,培养温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为20d。
7. 根据权利要求1所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:当采用 $\text{CaCl}_2$ 为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为: $\text{CaCl}_2$ 浓度为1~5mg/L,培养温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为10~40d。
8. 根据权利要求1或7所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:当采用 $\text{CaCl}_2$ 为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为: $\text{CaCl}_2$ 浓度为5mg/L,培养温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为40d。
9. 根据权利要求1所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:所述低温锻炼处理的控制参数为:温度为 $5^{\circ}\text{C}$ ,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为1500lx,处理3~7天。
10. 根据权利要求1或9所述的一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,其特征在于:所述低温锻炼处理的控制参数为:温度为 $5^{\circ}\text{C}$ ,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为1500lx,处理5天。

## 一种提高红苞凤梨抗寒性的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于观赏花卉栽培技术领域,具体涉及一种提高红苞凤梨抗寒性的方法。

### 背景技术

[0002] 红苞凤梨又名金边凤梨、艳凤梨,为凤梨科凤梨属多年生地生性常绿草本。红苞凤梨花期持久,植株粗犷奇特,富有野趣,果形如菠萝亦经久耐赏,因此又被誉为“菠萝花”。红苞凤梨原产地为阿根廷,喜欢温暖湿润的环境和通风良好的生存条件,喜欢阳光能耐干旱;红苞凤梨对生长地的阳光有一定的要求,如果阳光照射不充足,那么就会影响其正常的生长发育。如果气温偏低红苞凤梨易遭受冷害,导致叶片与花变色,严重时甚至枯萎腐败。短时间的低温或极高温,虽然会对生长造成一定危害,但当温度恢复正常后植株仍可生长良好。目前研究指出最适宜凤梨生长的温度为22-25℃,日温22-28℃,夜温15-18℃,相差6℃以上是最好的日夜温差,而10℃为最佳温差。因此可以看出红苞凤梨对冬季的温度要求很严,当低于3-6℃就不能在室外安全越冬。解决红苞凤梨植株的低温伤害一直是生产上的一个重要课题,并且受到科学工作者的重视,但目前还没有很好的栽培措施来提高红苞凤梨植株的抗寒性,并实现其在冬季温度较低地区的室外栽培。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明旨在提供一种提高红苞凤梨抗寒性的方法以解决上述问题。本发明的技术方案为:

[0004] 一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,包括以下步骤:

[0005] 步骤1,将红苞凤梨组培苗接种到含有低温处理剂的MS培养基培养;

[0006] 步骤2,培养完成后,再进行低温锻炼处理。

[0007] 优选地,所述红苞凤梨组培苗高度为3~4cm,具有3-5条根和5-8片叶。

[0008] 进一步地,当采用ABA为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:ABA浓度为1~12mg/L,培养温度为25±2℃,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为10~40d。优选控制参数为:ABA浓度为8mg/L,培养时间为30d。

[0009] 进一步地,当采用SA为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:SA浓度为1~5mg/L,培养温度25±2℃,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为10~40d。优选控制参数为:SA浓度为5mg/L,培养时间为20d。

[0010] 进一步地,当采用CaCl<sub>2</sub>为低温处理剂时,所述培养过程的控制参数为:CaCl<sub>2</sub>浓度为1~5mg/L,培养温度25±2℃,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为10~40d。优选控制参数为:CaCl<sub>2</sub>浓度为5mg/L,培养时间为40d。

[0011] 进一步地,所述低温锻炼处理的控制参数为:温度为5℃,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为1500lx,处理3~7天。

[0012] 优选地,所述低温锻炼处理的控制参数为:温度为5℃,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为1500lx,处理5天。

[0013] 本发明的有益效果是:采用本发明处理后的红苞凤梨,可以提高其体内的保护酶系统(SOD、POD、CAT)活性,来减轻低温胁迫对红苞凤梨的伤害,使叶片结构保持完整性,缓解了叶绿素降解,促进了光合作用,从而提高了红苞凤梨的整体抗寒性。

## 附图说明

[0014] 图1为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片膜透性的影响曲线。

[0015] 图2为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片MDA含量的影响曲线。

[0016] 图3为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片叶绿素含量的影响曲线。

[0017] 图4为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片SOD活性的影响曲线。

[0018] 图5为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片POD活性的影响曲线。

[0019] 图6为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片CAT活性的影响曲线。

[0020] 图7为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片可溶性蛋白的影响曲线。

[0021] 图8为本发明对比例1中处理时间对红苞凤梨叶片可溶性糖的影响曲线。

[0022] 图9为本发明对比例2中不同ABA浓度及培养时间对红苞凤梨相对电导率的影响曲线。

[0023] 图10为本发明对比例2中不同ABA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片MDA含量的影响曲线。

[0024] 图11为本发明对比例2中不同ABA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片叶绿素含量的影响曲线。

[0025] 图12为本发明对比例2中不同ABA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片可溶性蛋白含量的影响曲线。

[0026] 图13为本发明对比例2中不同ABA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片可溶性糖含量的影响曲线。

[0027] 图14为本发明对比例3中不同SA浓度及培养时间对红苞凤梨相对电导率的影响曲线。

[0028] 图15为本发明对比例3中不同SA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片MDA含量的影响曲线。

[0029] 图16为本发明对比例3中不同SA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片叶绿素含量的影响曲线。

[0030] 图17为本发明对比例3中不同SA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片可溶性蛋白含量的影响曲线。

[0031] 图18为本发明对比例3中不同SA浓度及培养时间对红苞凤梨叶片可溶性糖含量的影响曲线。

[0032] 图19为本发明对比例4中不同CaCl<sub>2</sub>浓度及培养时间对红苞凤梨相对电导率的影响曲线。

[0033] 图20为本发明对比例4中不同CaCl<sub>2</sub>浓度及培养时间对红苞凤梨叶片MDA含量的影响曲线。

[0034] 图21为本发明对比例4中不同CaCl<sub>2</sub>浓度及培养时间对红苞凤梨叶片叶绿素含量的影响曲线。

[0035] 图22为本发明对比例4中不同CaCl<sub>2</sub>浓度及培养时间对红苞凤梨叶片可溶性蛋白含量的影响曲线。

[0036] 图23为本发明对比例4中不同CaCl<sub>2</sub>浓度及培养时间对红苞凤梨叶片可溶性糖含量的影响曲线。

### 具体实施方式

[0037] 在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0038] 下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

[0039] 在本发明的具体实施例中,生理生化指标的测定均以叶片为材料,样品的选取采用随机抽样法进行,重复3次。具体包括以下指标:

[0040] (1) 外观形态指标:包括叶片颜色,叶片卷曲和枯萎程度。每个指标按叶片受冷害的程度不同将其分为3个等级。分级标准如表1所示。

[0041] 表1 外观分级标准

序号	项目	等级 (Ranks)		
		A	B	C
[0042]	1 叶片颜色	叶片翠绿色	叶片轻微失绿	叶片黄绿色
	2 叶片卷曲程度	叶片舒展	叶尖出现卷曲	叶尖叶缘都卷曲
	3 叶片枯萎程度	叶片表现正常	少量细小褐色斑点	大片的褐色斑块

[0043] (2) 叶绿素的测定:使用80%丙酮法(熊庆娥,植物生理学实验教程[M],成都:四川科学技术出版社,2003.8)。

$$[0044] \quad Ca = (12.70D_{663} - 2.690D_{645}) \times (V / (W \times 1000)), \quad [1]$$

$$[0045] \quad Cb = (22.90D_{645} - 4.680D_{663}) \times (V / (W \times 1000)), \quad [2]$$

$$[0046] \quad Ct = Ca + Cb = (20.210D_{645} + 8.020D_{663}) \times (V / (W \times 1000)), \quad [3].$$

[0047] 式[1]~[3]中,OD为测定波长下的光密度值,下标表示测定波长;V为叶绿素提取液总体积(ml);W为材料鲜重(g);Ca为叶绿素a的浓度;Cb为叶绿素b的浓度;Ct为总叶绿素浓度。

[0048] (3) 可溶性糖和MDA的测定:参照现代植物生理学实验指南(熊庆娥,植物生理学实验教程[M],成都:四川科学技术出版社,2003.8)。

$$[0049] \quad C1 (\mu\text{mol/l}) = 11.710D_{450}, \quad [4]$$

$$[0050] \quad C2 (\mu\text{mol/l}) = 6.45 (OD_{532} - OD_{600}) - 0.560D_{450}, \quad [5]$$

$$[0051] \quad \text{可溶性糖的含量} (\mu\text{mol/gFW}) = C \times V \times 10^{-3} / W, \quad [6]$$

$$[0052] \quad \text{丙二醛含量} (\mu\text{mol/gFW}) = C \times V \times 10^{-3} / W, \quad [7]$$

[0053] 式[4]~[7]中,C1:提取液中可溶性糖的浓度( $\mu\text{mol/l}$ );C2:提取液中MDA的浓度( $\mu\text{mol/l}$ );C:提取液中MDA或可溶性糖的浓度( $\mu\text{mol/l}$ );V:样品提取液总体积(ml);W:样品鲜

重(g)。

[0054] (4) 可溶性蛋白的测定:采用考马斯亮蓝G-250法(熊庆娥,植物生理学实验教程[M],成都:四川科学技术出版社,2003.8)。

[0055] 蛋白质含量(mg/g) = (查得的蛋白质含量(μg) × 提取液总体积(ml) × 稀释倍数) / (样品质量(g) × 测定时用提取液体积(ml) × 1000)

[0056] (5) SOD活性的测定:参照李合生的氮蓝四唑法(李合生,植物生理生化实验园林和测定技术[M],北京:高等教育出版社,2003.6)。

[0057] SOD活性(酶活单位 · FW/g) =  $2(A_1 - A_2) \times V / A_1 \times W \times V_t$ , [8]

[0058] 式[8]中,A<sub>1</sub>:照光对照管的吸光度;A<sub>2</sub>:样品管的吸光度;V:样品液的总体积(ml);V<sub>t</sub>:测定样品时样品用量(ml);W:鲜重(g)

[0059] (6) POD活性的测定:参照愈创木酚法(熊庆娥,植物生理学实验教程[M],成都:四川科学技术出版社,2003.8)。

[0060] 以每分钟内△A<sub>470</sub>变化0.01为1个过氧化物酶活性单位,计算其活力。

[0061] 过氧化物酶活性( $u \cdot g^{-1} \cdot \min^{-1}$ ) =  $\frac{\Delta A_{470} \times V_T}{t \times W \times V_S \times 0.01}$ , [9]

[0062] 式[9]中,△A<sub>470</sub>为反应时间内吸光值的变化;W为材料鲜重(g);V<sub>T</sub>为提取酶液总体积(ml);V<sub>S</sub>为测定时取用酶液体积(ml);T为反应时间(min)。

[0063] (7) CAT活性的测定:采用紫外吸收法,在孔祥生(孔祥生,植物生理学实验技术[M],北京:中国农业出版社,2008.2)的方法上稍加变动,取1cm口径石英比色杯,依次加入0.2ml酶液(以提取液做参比)、2.3ml 0.05mol/L PH7.8磷酸缓冲液混匀,放入比色槽中加入0.5ml0.1MH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,迅速盖上盖子,于240nm波长下测定,立即读数,每隔30s读数一次,共3min7次。

[0064] 过氧化氢酶活性( $u \cdot g^{-1} \cdot \min^{-1}$ ) =  $\frac{\Delta A_{240} \times V_r}{0.1 \times V_1 \times t \times FW}$ , [10]

[0065] 式[10]中,V<sub>r</sub>为粗酶提取液总体积(mL);V<sub>1</sub>是测定用粗酶液体积(mL);FW是样品鲜重(g);0.1为A<sub>240</sub>每下降0.1为1个酶活单位(μ);t为加过氧化氢到最后一次读数时间(min)。

[0066] (8) 组织浸出液电导率:采用电导仪法(熊庆娥,植物生理学实验教程[M],成都:四川科学技术出版社,2003.8)。

[0067] 相对电导率(%) = 样品煮前电导率(μs/cm) / 样品煮后电导率(μs/cm) × 100,危害程度 = 冻害处理的相对电导率 / 对照的相对电导率。

[0068] 采用SPSS、Excel等软件对上述指标数据进行处理和分析,并进行方差分析和LSD检验。

[0069] 实施例1

[0070] 本实施例提供一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,包括以下步骤:

[0071] 步骤1,将高度为3~4cm、具有3-5条根和5-8片叶红苞凤梨组培苗加入含有ABA的MS培养基培养,培养过程的控制参数为:ABA在所述MS培养基中的终浓度为8mg/L,培养温度为25±2℃,光照度为1500lx,湿度为80%,培养时间为30d。

[0072] 步骤2,培养完成后,转入人工气候培养箱中进行低温锻炼处理,控制参数为:温度为5℃,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为15001x,处理5天。

[0073] 对本实施例处理完的红苞凤梨测定其外观分级、叶绿素含量、可溶性糖和MDA含量、可溶性蛋白含量、SOD/POD/CAT活性和组织浸出液电导率,具体如下:

[0074] (1) 外观形态:叶片颜色A等级,叶片卷曲程度B等级,叶片枯萎程度B等级。

[0075] (2) 叶绿素含量为0.35mg/gFW,可溶性糖含量为14.10mg/gFW,MDA含量为1.20ug/mgFW,可溶性蛋白含量为2.50mg/Gfw,SOD活性为166.4u/(g·h)FW,POD的活性为6.77u/(min·g)FW,CAT的活性为10.8u/(min·g)FW,组织浸出液电导率为16%。

[0076] 实施例2

[0077] 本实施例提供一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,包括以下步骤:

[0078] 步骤1,将高度为3~4cm、具有3-5条根和5-8片叶红苞凤梨组培苗加入含有SA的MS培养基培养,培养过程的控制参数为:SA在所述MS培养基中的终浓度为5mg/L,培养温度25±2℃,光照度为15001x,湿度为80%,培养时间为20d。

[0079] 步骤2,培养完成后,转入人工气候培养箱中进行低温锻炼处理,控制参数为:温度为5℃,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为15001x,处理5天。

[0080] 对本实施例处理完的红苞凤梨测定其外观分级、叶绿素含量、可溶性糖和MDA含量、可溶性蛋白含量、SOD/POD/CAT活性和组织浸出液电导率,具体如下:

[0081] (1) 外观形态:叶片颜色A等级,叶片卷曲程度B等级,叶片枯萎程度B等级。

[0082] (2) 叶绿素含量为0.38mg/gFW,可溶性糖的含量为14.00mg/gFW,MDA的含量为1.10ug/mgFW,可溶性蛋白含量为3.20mg/gFW,SOD活性为460.26u/(g·h)FW,POD的活性为7.85u/(min·g)FW,CAT活性为10.93u/(min·g)FW,组织浸出液电导率为16%。

[0083] 实施例3

[0084] 本实施例提供一种提高红苞凤梨抗寒性的方法,包括以下步骤:

[0085] 步骤1,将高度为3~4cm、具有3-5条根和5-8片叶的红苞凤梨组培苗移入含有CaCl<sub>2</sub>的MS培养基培养,培养过程的控制参数为:CaCl<sub>2</sub>在所述MS培养基中的终浓度为5mg/L,培养温度25±2℃,光照度为15001x,湿度为80%,培养时间为40d。

[0086] 步骤2,培养完成后,转入人工气候培养箱中进行低温锻炼处理,控制参数为:温度为5℃,湿度为80%,光照时间为10h/d,光照度为15001x,处理5天。

[0087] 对本实施例处理完的红苞凤梨测定其外观分级、叶绿素含量、可溶性糖和MDA含量、可溶性蛋白含量、SOD/POD/CAT活性和组织浸出液电导率,具体如下:

[0088] (1) 外观形态:叶片颜色A等级,叶片卷曲程度B等级,叶片枯萎程度B等级。

[0089] (2) 叶绿素含量为0.50mg/gFW,可溶性糖为14.00mg/gFW,MDA含量为0.30ug/mgFW,可溶性蛋白含量为5.00mg/gFW,SOD活性为256.77u/(g·h)FW,POD活性为11.25u/(min·g)FW,CAT活性为12.4u/(min·g)FW,组织浸出液电导率为13%。

[0090] 实施例4

[0091] 参数考察过程:

[0092] (1) 考察了人工气候培养箱中一系列低温处理时间(0d、1d、3d、5d、7d、9d)对红苞凤梨叶片外观形态、相对电导率、叶片MDA含量、叶绿素含量、SOD/CAT/POD、可溶性蛋白、可溶性糖的影响,其他实验条件同实施例1。外观形态结果如表2所示。

[0093] 表2 不同处理时间对叶片外观形态的影响

处理 (Treatment)	外观形态		
	叶片颜色	叶片卷曲程度	叶片枯萎程度
0d	正常	正常	正常
1d	未出现明显症状	未出现明显症状	未出现明显症状
3d	老叶叶尖颜色变淡	老叶叶尖开始出现轻微卷曲	未出现明显症状
5d	少数叶尖颜色变淡	叶尖卷曲下垂, 叶缘开始出现卷曲	叶尖出现黄化, 偶有褐色斑点出现
7d	叶尖发黄、叶缘失绿	叶尖严重卷曲下垂, 叶缘少量卷曲	叶尖枯萎, 并伴有褐色斑块
9d	叶尖发黄、叶缘失绿	叶尖严重卷曲下垂, 叶缘大部分卷曲下垂	叶尖严重枯萎, 叶缘出现黄化, 褐色斑块面积扩大

[0095] 通过表2的数据可以看出,第5d开始,红苞凤梨叶片的叶缘开始卷曲,叶尖开始枯萎并偶有褐斑出现,第7d枯萎症状扩大,9d后枯斑面积达到叶面积的20%。

[0096] 图1显示,在低温处理5d时相对电导率达到最小值。说明低温锻炼5d,在一定程度上缓解了红苞凤梨叶片膜损伤程度,再延长低温时间则膜透性增加(相对电导率是衡量细胞膜透性的重要指标)。

[0097] 图2显示,红苞凤梨叶片MDA含量在0-5d时逐步下降,到第5d时为0d时的73.73%,之后又逐步上升,到第9d时接近处理0d的水平。这也与相对电导率变化趋势基本一致。

[0098] 图3显示,红苞凤梨叶片的叶绿素含量在低温锻炼0-5d内缓慢上升,在第5d时显著高于处理0d,比0d提高了27.09%。在5d后叶绿素含量下降,到第9d时达到最低,比处理0d降低了33.49%。

[0099] 图4显示,SOD活性在处理第1d时无显著升高,到第3-5d显著升高,在第5d时达到最高,为处理0d时的3.6倍。5d后SOD活性开始下降,至第9d时已降为第5d时的51.54%。

[0100] 图5显示,POD的活性在第1d显著上升,为处理0d的1.77倍,之后1-5d内POD活性无显著变化,在第5d时POD活性最高,是处理0d的2.11倍,在5-9d内POD活性略有下降,但变化不显著。

[0101] 图6显示,CAT活性在低温锻炼第1-3d内没有显著变化,但到第5d时显著升高,达到处理0d的1.25倍,之后显著下降,在7d时为第5d的53.09%,处理9d后与第7d无显著变化。在整个低温处理期间红苞凤梨叶片SOD活性变化幅度都高于POD和CAT活性。

[0102] 图7显示,可溶性蛋白含量在处理第1d后即显著上升,到第5d时达到最高,是处理0d的1.66倍。处理第7d时,可溶性蛋白含量显著下降,而7-9d内可溶性蛋白含量没有显著变化。



[0103] 图8显示,可溶性糖含量在低温锻炼前5d逐渐升高,第5d时为处理0d的1.4倍,5d后逐步下降,在9d时仅为第5d的27.7%,第0d时的67.11%。

[0104] 因此,综合考虑,将低温处理时间定在3~7d,优选为5d。

[0105] 同样,对实施例2和实施例3也按照实施例4的方式进行了低温处理的考察,低温处理时间定在3~7d,优选为5d。综上,实施例1、实施例2和实施例3的处理在低温锻炼的基础上进一步提高了红苞凤梨的抗寒性。

[0106] (2) 考察了不同ABA浓度(1、2、4、8、12mg/L,分别对应A1、A2、A3、A4、A5)及培养时间(10d、20d、30d、40d)对红苞凤梨相对电导率、叶片MDA含量、叶绿素含量、SOD/CAT/POD、可溶性蛋白、可溶性糖的影响,其他实验条件同实施例1。

[0107] 图9显示,ABA各浓度培养10-40d后的红苞凤梨叶片相对电导率都有显著下降。在培养10-20d后各处理相对电导率下降,且都在20d时下降到最低值,在培养20-40d后则缓慢上升。在含ABA培养基上培养20d后,处理A4的相对电导率最低,低于不添加ABA的对照组(CK)91.74%,而且分别比处理A1、A2、A3、A5降低了16.3%、27.47%、36.15%、10.49%。在含ABA培养基上培养30d、40d后,各处理与CK相比都有显著的差异,而且A4的相对电导率一直为最低值。

[0108] 图10显示,ABA各浓度培养10-40d后的红苞凤梨MDA含量在培养10-30d后无显著变化,而在培养30-40d后,MDA含量显著上升。各处理在培养10-40d的过程中MDA含量始终低于CK,在培养20d后,各处理达到最低值。处理A4MDA含量在20d时仅为CK的42.67%,在40d时为CK的75.73%,均低于其他各处理。在培养10-30d之间不同浓度处理之间差异显著,而在培养30-40d后差异不显著,各处理间MDA含量大小顺序为A3>A2>A1>A5>A4。

[0109] 图11显示,处理A1-A3在培养10-40d后低温处理的过程中,叶绿素的含量均低于CK,在浓度A3中培养30d时叶绿素含量达到最低值,为CK的69.52%。然而,处理A4、A5的叶绿素含量一直高于CK,在A4培养基上培养20d后,叶绿素含量比A1、A2、A3、A5高39.51%、66.44%、72.92%和7.54%。在A4培养基上培养30d叶绿素含量达到最大值,分别高于CK17.51%和9.09%,在培养40d时达到最小值,但仍然分别高于CK15.15%和2.54%。

[0110] 表3给出了不同浓度及时间ABA处理对红苞凤梨叶片SOD、CAT和POD活性的影响。

[0111] 表3 不同浓度及时间ABA处理对红苞凤梨叶片SOD、CAT和POD活性的影响

保护 酶系	处 理	时间 (d)			
		10	20	30	40
超氧化物歧化酶 SOD activity U/ (g·h) FW	CK	64.98±1.48bc	75.16±0.17d	55.69±0.26e	72.16±0.51f
	A1	68.79±2.41bc	233.55±3.72b	165.03±1.78c	211.73±0.7c
	A2	66.14±0.66bc	144.68±1.56c	151.09±1.9cd	171.81±0.81d
	A3	65.14±0.54bc	130±2.43cd	116.95±0.99d	144.31±0.42b
	A4	138.93±3.43a	369.69±2.3a	298.7±0.92a	274.57±0.31a
过氧化物酶 POD activity $\Delta A470/(\text{min}\cdot\text{g})$ FW	A5	106.59±2.1ab	337.86±2.69a	247.68±1.18b	244.52±1.04b
	CK	5.19±0.66c	4.98±0.37b	5.18±0.8e	5.89±0.46b
	A1	7.91±0.36b	8.67±1.94a	6.9±0.32c	6.6±0.83ab
	A2	7.75±0.72b	7.78±0.24ab	6.67±0.34cd	6.52±0.41ab
	A3	5.31±0.31c	7.05±0.86ab	5.36±0.35de	6.24±0.96ab
过氧化氢酶 CAT activity $\Delta A240/(\text{min}\cdot\text{g})$ FW	A4	10.16±0.39a	10.25±1.56a	10.27±0.36a	9±1.42a
	A5	8.54±0.96b	9.91±1.04a	9.84±0.6b	8.45±1.11ab
	CK	7.87±1.72b	5.87±1.29a	6.88±1.84ab	7.93±1.69bc
	A1	9.87±1.29ab	8.67±1.01a	5.2±0.44b	5.01±0.9cd
	A2	9.73±1.01ab	6.53±2.34a	4.44±1.03b	3.04±0.55d
[0112]	A3	9.6±2.12ab	5.33±1.8a	3.95±0.92b	3.01±0.59d
	A4	12.73±0.81a	9.73±2.6a	11.47±1.01a	11.9±0.72a
	A5	11.2±0.4ab	9.2±0.4a	8.53±1.57ab	8.86±1.42ab

[0113] 通过表3的数据可以看出,整体上,经过ABA处理过的红苞凤梨叶片SOD活性显著高于对照。在培养10d时,各处理的SOD活性升高不显著,处理A4的SOD活性是CK的1.14倍,而处理A3只比CK高了0.25%。在培养20-40d时各处理都能维持较高的活性,在30d时,各处理的SOD活性达到最大值,处理A4的SOD活性一直显著高于其他浓度处理,达到CK的4.36倍,而处理A5也达到CK的3.45倍。在A1-A3处理浓度之间,随着浓度的增加,SOD活性下降,但始终高于CK。各处理的SOD活性大小顺序为A4>A5>A1>A2>A3>CK。

[0114] 在整个处理过程中,各处理都维持了较高的POD活性,均呈现先升高(10-20d)后降低(20-40d)的趋势,与CK相比较都有比较明显提高。在ABA培养20d时,各处理POD活性达到最大值,分别比CK高了67.46%、50.29%、36.21%、98%、91.56%,处理A1-A3之间随着浓度的增加,POD活性下降。处理A4在所有处理中POD活性最高,在10、20、30、40d分别比CK高了

95.95%、98%、97.87%、52.77%。各浓度处理间的POD活性也存在着差异,处理A4一直高于其他处理,在20d时,分别比A1、A2、A3、A5高18.23%、31.75%、45.36%、3.36%。

[0115] 与SOD、POD不同,处理A1、A2、A3的CAT活性在培养10-40d内一直呈现下降趋势,且随着浓度增长下降越明显,在培养30d以后,已全部低于处理CK,在培养30d时,CAT活性是CK的75.57%、64.55%、57.43%。因此,与CK相比,处理A1、A2、A3的差异性不显著。而处理A4、A5一直显著高于CK,提高了红苞凤梨的CAT活性;处理A4在处理30d时CAT活性达到最大值,高于CK 66.64%,处理A5则在20d时达到最大值,高于CK56.82%。

[0116] 图12显示,处理A1、A4、A5可溶性蛋白含量在整个处理过程中一直高于对照CK,在培养10-40d后,处理A4还一直高于其他浓度处理;各处理的最大值出现在培养30d时,分别高于CK3.28%、26.49%、14.81%。而处理A2、A3在整个处理过程中一直低于处理CK,在40d时达到最小值,分别低于CK15.78%和19.88%。

[0117] 图13显示,在处理10d时,各处理浓度下可溶性糖含量都高于CK,在处理20-40d时,各处理可溶性糖含量表现出下降趋势,在40d时,已与CK无显著差异。处理A1、A4、A5可溶性糖含量在培养10、20、30d后都显著高于CK,处理A4在培养20d时达到最大值,高于CK58.54%;而在培养40d时差异不显著,处理A1、A4、A5只低于CK6.07%、16.36%和0.16%。处理A2、A3培养20-40d内,可溶性糖含量则一直低于CK。说明8mg/LABA处理20d可显著提高红苞凤梨叶中的可溶性糖含量。

[0118] 因此,综合考虑,本发明步骤1的培养过程,ABA浓度在6~10mg/L,培养时间在20~30天。并且将ABA浓度8mg/L,培养时间30天作为优选条件。

[0119] (3) 考察了不同SA浓度(1、2、3、4、5mg/L,分别对应S1、S2、S3、S4、S5)及培养时间(10d、20d、30d、40d)对红苞凤梨相对电导率、叶片MDA含量、叶绿素含量、SOD/CAT/POD、可溶性蛋白、可溶性糖的影响,其他实验条件同实施例2。

[0120] 图14显示,SA处理后的红苞凤梨相对电导率全都有所下降,呈现出先下降(10-30d)后上升(30-40d)的趋势。在培养10、20、30d时,各处理红苞凤梨叶片相对电导率显著低于不添加SA的对照(CK);培养30d时,各处理的相对电导率值最低,分别低于CK51.98%、34.68%、31.13%、76.69%、77.51%;在培养40d时,各处理与CK相比无显著差异。处理S1、S2、S3随着SA浓度的增加,相对电导率增加;处理S5的相对电导率在培养10、20、30d内一直显著低于CK和其他浓度处理,在30d时,达到最小值,分别低于S1、S2、S3、S4处理14.38%、24.13%、26.13%、0.46%。

[0121] 图15显示,不同浓度及时间处理下的红苞凤梨叶片MDA含量全都低于对照CK。处理S1、S3、S4、S5随着处理时间的延长,MDA含量稳步降低,与CK相比有显著差异;在SA中培养10d时各处理之间无显著差异;在40d时各处理达到最小值,分别是CK的60.65%、91.33%、45.75%、41.09%;处理S2与CK相比MDA含量无显著差异。处理S5在培养20、30、40d时MDA含量一直显著低于对照及其他浓度处理,在40d时的MDA含量达到最低值,分别比处理S1、S2、S3、S4低了32.24%、47.62%、55.01%、10.18%,因此细胞过氧化产物积累最少。

[0122] 图16显示,处理S4叶绿素含量显著高于CK,在培养30d时达到最大值,分别高于CK34.82%、12.31%。处理S2、S3在培养10-40d的过程中叶绿素含量都低于CK,处理S3在培养20d时最高,低于对照25.61%,表明叶绿素即使在经过S2、S3处理后也受到了不同程度的破坏。处理S1、S5虽然叶绿素含量一直高于对照,但是与CK相比差异不显著,表明SA处理对

提高红苞凤梨叶绿素含量效果不显著。

[0123] 表4给出了不同浓度及时间ABA处理对红苞凤梨叶片SOD、CAT和POD活性的影响。

[0124] 表5 不同浓度及时间SA处理对红苞凤梨叶片SOD、CAT和POD活性的影响

保护酶系	处 理	时间 (d)				
		10	20	30	40	
[0125]		CK	64.98±1.48d	75.16±0.17b	55.69±0.26d	72.16±0.51c
	超氧化物歧化酶	S1	156.52±3.57c	348.79±35.45a	156.8±23.42b	147.14±21.87b
		S2	120±10.27c	332.89±25.57a	83.48±12.66c	111.06±13.01b
	SOD activity	S3	154.28±17.05c	347.71±17.31a	84.44±13.37c	115.51±14.41b
	U/ (g·h) FW	S4	193.53±12.14b	348.9±3.86a	166.4±32.14b	175.58±30.74b
		S5	379.22±22.25a	460.26±26.16a	370.2±19.52a	376.87±22.83a
		CK	5.19±0.66b	4.98±0.37ab	5.18±0.8ab	5.89±0.46a
	过氧化物酶	S1	7.6±0.13a	7.16±1.09a	5.59±0.85ab	6.15±0.82a
	POD activity	S2	5.3±1.04b	5.38±0.73ab	5.27±1.31ab	6.05±0.29a
	ΔA470/ (min·g)FW	S3	5.28±0.54b	4.26±0.42b	4.16±0.47b	5.86±0.19a
[0126]		S4	7.3±0.39a	7.41±1.5a	6.77±0.56a	6.48±0.24a
		S5	7.84±0.02a	7.85±0.83a	7.06±0.68a	6.55±0.45a
		CK	7.87±1.72b	5.87±1.29b	6.88±1.84b	7.93±1.69c
	过氧化氢酶	S1	9.2±1.01b	8.67±0.92ab	7.72±1.32b	10.77±0.47bc
	CAT activity	S2	8.13±0.53b	6.99±1.1b	7.49±0.9b	8.05±0.59c
	ΔA240/ (min·g)FW	S3	8±1.06b	6.13±0.98b	6.95±0.81b	7.95±0.7c
		S4	13.47±1.89a	10.27±0.42a	10.8±0.8a	12.85±1.16a
		S5	13.53±1.3a	10.93±0.61a	11.8±0.87a	13.95±0.63a

[0127] 从表5可以看出,整体上,经过SA处理的红苞凤梨叶片SOD活性都有所上升,培养20-30d时比培养10-20d略有降低,但都显著高于对照CK。处理S1、S2、S3、S4在培养20d时SOD活性最高,与CK差异显著,但处理间没有显著差异,分别是CK的3.64倍、3.43倍、3.63倍和3.64倍;在培养10、30、40d时SOD活性也有所提高,但提高幅度明显低于20d。处理S5与CK存在显著差异,在培养10、20、30、40d时分别是CK的4.83倍、5.12倍、5.64倍和4.22倍;在培养30d时分别是处理S1、S2、S3、S4的1.36倍、3.43倍、3.38倍和1.22倍。

[0128] 在整个处理过程中,S1、S4、S5的POD活性与对照相比较都有显著差异;其中处理S5

在处理20d和30d时与对照CK相比提高幅度最大,分别提高了84.19%、69.85%,差异显著;处理S2的SOD活性虽有提高,但与对照相比无明显差异,在培养10-40d内分别低于CK2.28%、2.03%、2.02%和2.69%。而处理S3的SOD活性完全低于对照,在培养20d时POD活性值最低,低于CK40.47%。

[0129] 与SOD相同,经过SA处理后的各处理CAT活性在整个处理过程中都高于处理CK。处理S4、S5一直都显著高于CK,在处理20d时处理S4、S5达到最大值,分别比对照CK高75%、86.36%。处理S1、S2、S3在培养10,20,30,40d虽然CAT活性与处理CK相比有所上升,但无明显差异。各处理CAT活性增加幅度大小的顺序为S5>S4>S1>S2>S3。

[0130] 图17显示,经过SA处理的可溶性蛋白含量在整个处理过程中都高于CK。处理S1、S4、S5的可溶性蛋白含量与CK相比有显著差异,在培养20d时各处理可溶性蛋白含量急剧下降,分别比CK高23.06%、62.86%、76.81%;在培养30d时可溶性蛋白含量急剧上升,之后稍后略有回落;处理S5的可溶性蛋白含量在培养30d时达到最大值为CK的1.68倍,处理S1、S2、S3、S4为S5的62.72%、56.35%、45.61%、82.09%。处理S2、S3相较于CK,虽然含量有所上升但无显著差异。各处理可溶性蛋白含量多少的顺序为S5>S4>S1>S2>S3>CK。

[0131] 图18显示,所有SA处理的可溶性糖含量在整个处理过程中都高于对照CK,呈现出先下降(10-20d)后上升(20-40d)的趋势。处理S5可溶性糖含量显著高于CK和其他浓度处理,在处理20d时达到最大值,高于对照59.64%,同时分别比处理S1、S2、S3、S4高19.96%、30.58%、48.19%和12.49%。处理S1、S2、S3、S4虽然可溶性糖含量高于CK,但与处理CK之间差异不显著。

[0132] 因此,综合考虑,本发明步骤1的培养过程,SA浓度在3~5mg/L,培养时间在20~30天。并且将SA浓度5mg/L,培养时间20天作为优选条件。

[0133] (4) 考察了不同CaCl<sub>2</sub>浓度(1、2、3、4、5mg/L,分别对应C1、C2、C3、C4、C5)及培养时间(10d、20d、30d、40d)对红苞凤梨相对电导率、叶片MDA含量、叶绿素含量、SOD/CAT/POD、可溶性蛋白、可溶性糖的影响,其他实验条件同实施例2。

[0134] 图19显示,经过不同浓度和时间CaCl<sub>2</sub>处理后的红苞凤梨叶片相对电导率全都显著低于不添加CaCl<sub>2</sub>的对照(CK),各处理的整体变化趋势是先降低(10-20d)后上升(20-40d),且各处理随着浓度的升高而下降。在处理20d时,各处理的相对电导率较CK下降得最多,处理C1、C2、C3、C4、C5分别为CK的67%、53.7%、51.28%、50.33%、43.65%。在培养20、30、40d时,各浓度处理间无明显差异。同时,处理C5的相对电导率在整个处理过程中一直最低,在培养20d时低于C1、C2、C3、C4、C5处理20.71%、18.75%、14.22%、13.68%。

[0135] 图20显示,经过不同浓度及时间CaCl<sub>2</sub>处理后,红苞凤梨叶片MDA含量都低于对照。处理C1虽然低于对照,但与CK相比差异不显著。在10d时,处理C2、C3、C4、C5与CK之间有显著差异,但浓度处理之间无明显差异。处理C2、C3、C4在培养10-30d时都显著低于对照,但在40d时急速上升,与对照差别急速减小,在40d时只分别比CK少了3.9%、5.57%、26.29%。处理C5在10-40d的处理过程中一直显著低于CK,30d时MDA含量最低,仅为CK的16.54%。各处理膜脂过氧化程度大小的顺序为CK>C1>C2>C3>C4>C5。

[0136] 图21显示,各CaCl<sub>2</sub>浓度处理直叶片叶绿素含量均高于CK,叶绿素含量随着浓度的增加而平稳增加。在处理30d时,各处理变化不显著。处理C1、C2、C3在处理10、20、40d时叶绿素含量虽然高于CK,但无显著差异,各处理最低分别只低于CK0.09%、2.7%、4.3%。处理C4

在培养20d时,显著高于CK,但在培养10、30、40d时无显著差异;处理C5叶绿素含量一直较高,明显高于CK和处理C1、C2、C3;处理C5在40d时达到最高值高于CK45.29%,且比处理C1、C2、C3高45.15%、37.41%、36.32%。

[0137] 表5给出了不同浓度及时间CaCl<sub>2</sub>处理对红苞凤梨叶片SOD、CAT和POD活性的影响。

[0138] 表5 不同浓度及时间CaCl<sub>2</sub>处理对红苞凤梨叶片SOD、POD和CAT活性的影响

[0139]	保护酶系	处理	时间 (d)			
			10	20	30	40
	超氧化物歧化酶	CK	64.98±1.48b	75.16±0.17b	55.69±0.26c	72.16±0.51b
		C1	136.69±4.94ab	117.8±2.58b	126.6±21.98bc	181.55±22.45a
	SOD activity	C2	149.89±22ab	129.42±21.74b	177.9±25.6b	229.83±36.44a
		C3	172.14±23.93ab	143.2±28.11b	184.77±34.8b	245.82±43.3a
	U/ (g·h)	C4	231.47±33.5a	244.99±29.59a	433.61±18.51a	254.88±23.38a
	FW	C5	235.45±40.88a	264.9±36.09a	468.69±25.9a	256.77±21.64a
过氧化物酶						
		CK	5.19±0.66c	4.98±0.37e	5.18±0.8e	5.89±0.46c
	POD activity	C1	5.42±0.48c	6.17±0.94e	6.87±0.27de	6.57±0.64c
		C2	5.75±0.48c	6.47±0.5cd	8.41±1.38cd	7.93±1.15bc
	ΔA470/ (min·g)	C3	6.17±0.43bc	8.49±0.62bc	9.28±0.39bc	9.27±0.35ab
[0140]		C4	7.85±1.32b	10.22±0.73ab	11.41±1.19ab	9.69±1.2ab
	FW	C5	10.52±0.16a	12.15±1.41a	13.09±0.85a	11.25±1.63a
过氧化氢酶						
		CK	7.87±1.72e	5.87±1.29b	6.88±1.84b	7.93±1.69c
	CAT activity	C1	9.07±2.2cd	6.8±0.8ab	8.93±2.08ab	8.44±0.58c
		C2	12.53±0.7bc	7.6±0.83ab	9.33±1.89ab	9.36±0.75bc
		C3	13.73±0.83ab	10.8±1.74ab	9.47±0.92ab	10.33±0.2bc
	ΔA240/ (min·g)	C4	16.27±1.27a	11.8±0.4ab	10.25±1.8ab	11.48±1.7b
	FW	C5	17.07±1.5a	14.27±1.25a	12.4±0.11a	15.3±1.4a

[0141] 从表5可以看出,整体上,经过CaCl<sub>2</sub>处理过的红苞凤梨叶片SOD活性都有所上升,

且随着浓度的升高而升高,表明CaCl<sub>2</sub>处理能提高红苞凤梨的SOD活性。处理C4、C5在整个处理过程中一直都能维持较高的SOD活性且与CK相比有显著性差异;在培养10和20d时都保持平稳增长,在培养20-30d时SOD活性急速上升达到最大值,分别是CK的6.79倍和7.42倍。处理C1、C2、C3在处理10-40d内呈现先下降(10-20d)后上升(20-40d)的趋势,但整体升高幅度明显低于C4、C5,与对照差异不显著。在40d时,各处理数值变化不大,是CK的2倍左右。说明在低温胁迫时,高浓度的CaCl<sub>2</sub>能有效的提高红苞凤梨的SOD活性,显著改善了植物体内的氧化-抗氧化环境。

[0142] 在整个处理过程中,所有浓度CaCl<sub>2</sub>处理POD活性都高于CK,且呈现出先升高(10-30d)后降低(30-40d)的趋势,因此各处理的最高值都出现在30d。处理C4、C5在30d时与CK相比提高幅度最大,分别是CK的1.16倍和1.47倍,因此差异十分显著。各处理间随着浓度的增加POD的活性升高,说明高浓度的CaCl<sub>2</sub>处理能提高POD活性,防止有害自由基的伤害,避免细胞膜的过氧化。各处理POD活性的大小顺序为C5>C4>C3>C2>C1>CK。

[0143] 与SOD、POD相同,经过CaCl<sub>2</sub>处理后的各处理CAT活性在整个处理过程中全都高于CK,各处理在10-40d内呈现出先下降后上升的趋势,且随着各处理浓度的上升CAT活性增加。在10d时,各处理与CK之间差异显著,但随后差异减小。处理C4、C5比CK增加幅度较大,在20d时达到最大值,分别是CK的1.01倍和1.43倍。处理C5在整个处理过程中CAT活性也都高于处理C1、C2、C3、C4,在20d时,分别是C5的47.66%、53.27%、75.7%、82.71%。

[0144] 图22显示,各CaCl<sub>2</sub>处理的可溶性蛋白含量在整个处理过程中都显著高于CK,在10-40d内呈现出先下降(10-20d)后上升(20-40d)的趋势,且随着浓度的增加可溶性蛋白含量稳步增加。在10d,40d时,各浓度处理间无显著差异;处理C5的可溶性蛋白含量不仅显著高于CK还高于其他处理浓度,在40d时含量最高,是CK的1.43倍,同时还高于C1、C2、C3、C4处理90.38%、47.67%、30.57%、20.48%。说明CaCl<sub>2</sub>浓度处理能增加红苞凤梨叶片内可溶性蛋白的积累,各处理可溶性蛋白含量多少的顺序为C5>C4>C3>C2>C1>CK。

[0145] 图23显示,所有CaCl<sub>2</sub>处理的可溶性糖含量在整个处理过程中都高于CK,呈现出先上升(10-30d)后上升(30-40d)的趋势,且各处理可溶性糖含量随着浓度的增加而平稳的增加,各处理浓度间差异显著性较小。在30d时各处理达到最大值,分别高于CK4.28%、23.9%、31.55%、32.48%、49.28%。处理C5一直高于其他浓度的处理,在30d时,分别高了C1、C2、C3、C4处理43.15%、20.48%、13.47%、12.68%。说明高浓度的CaCl<sub>2</sub>处理能增加红苞凤梨叶片内的可溶性糖的积累。

[0146] 因此,综合考虑,本发明步骤1的培养过程,CaCl<sub>2</sub>浓度在3~5mg/L,培养时间在30~40天。并且将CaCl<sub>2</sub>浓度5mg/L,培养时间40天作为优选条件。

[0147] 综上,采用本发明处理后的红苞凤梨,可以提高其体内的保护酶系统(SOD、POD、CAT)活性,来减轻低温胁迫对红苞凤梨的伤害,使叶片结构保持完整性,缓解了叶绿素降解,促进了光合作用,从而提高了红苞凤梨的整体抗寒性。

[0148] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

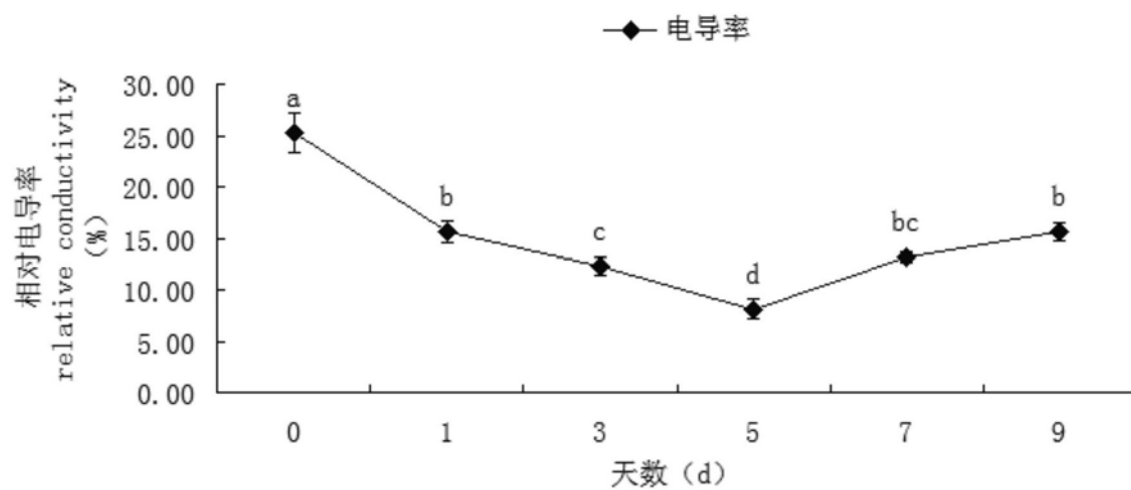


图1

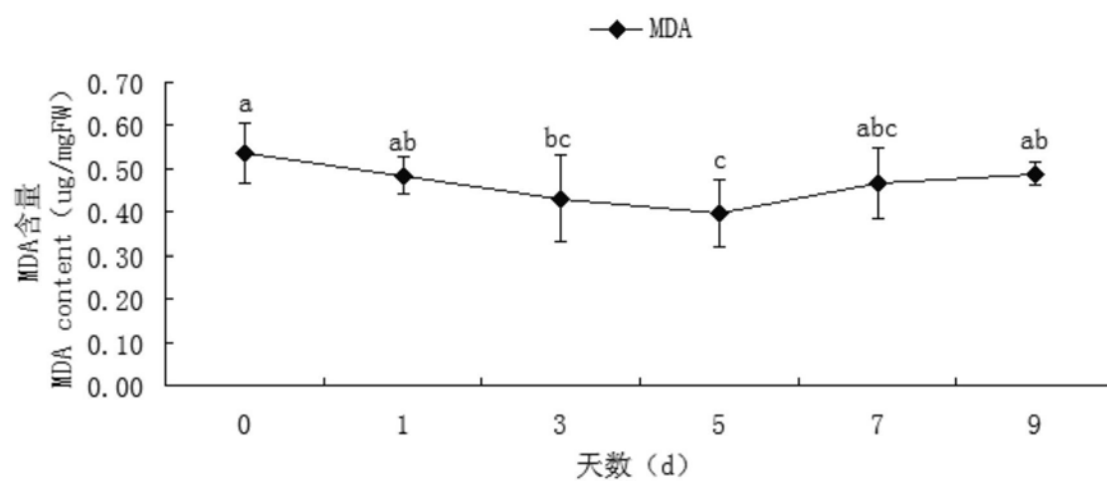


图2



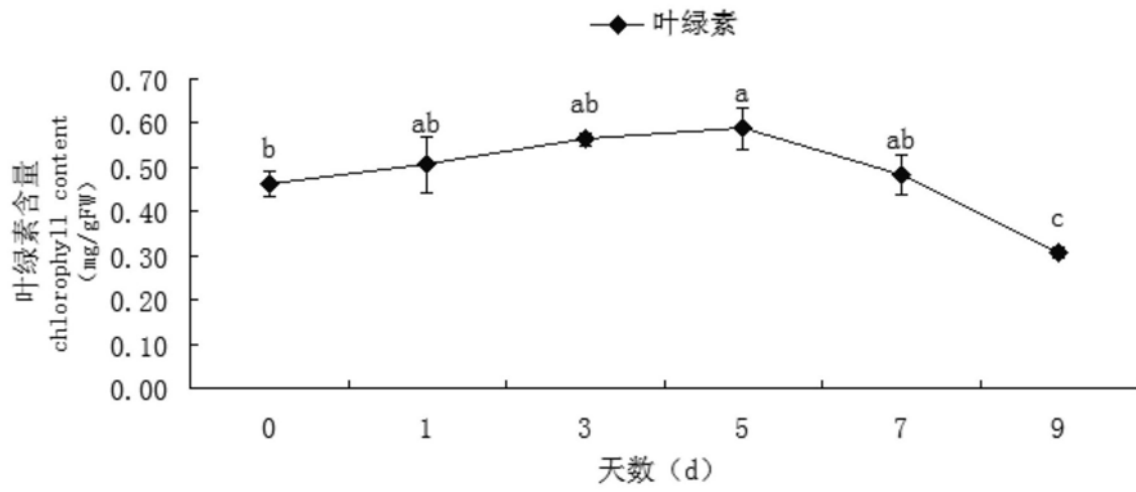


图3

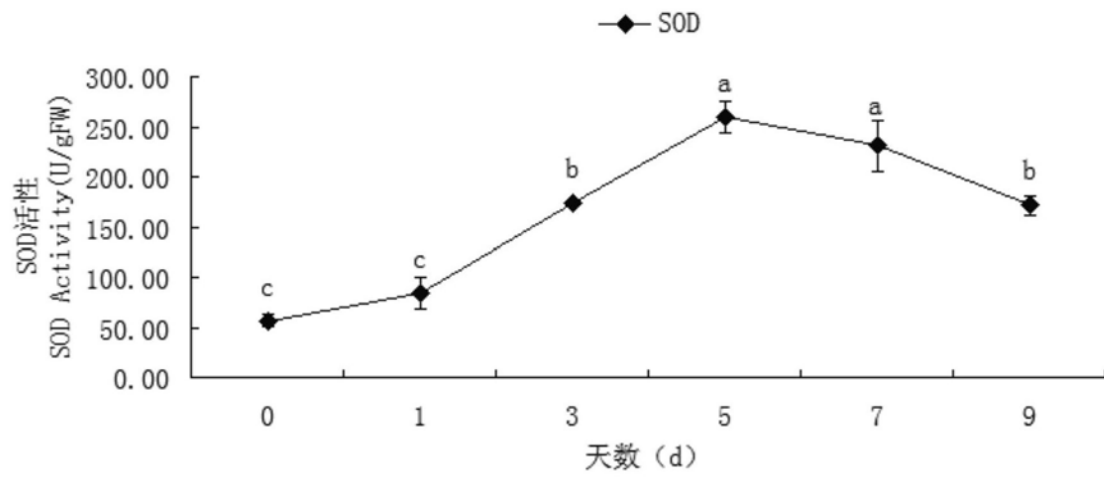


图4

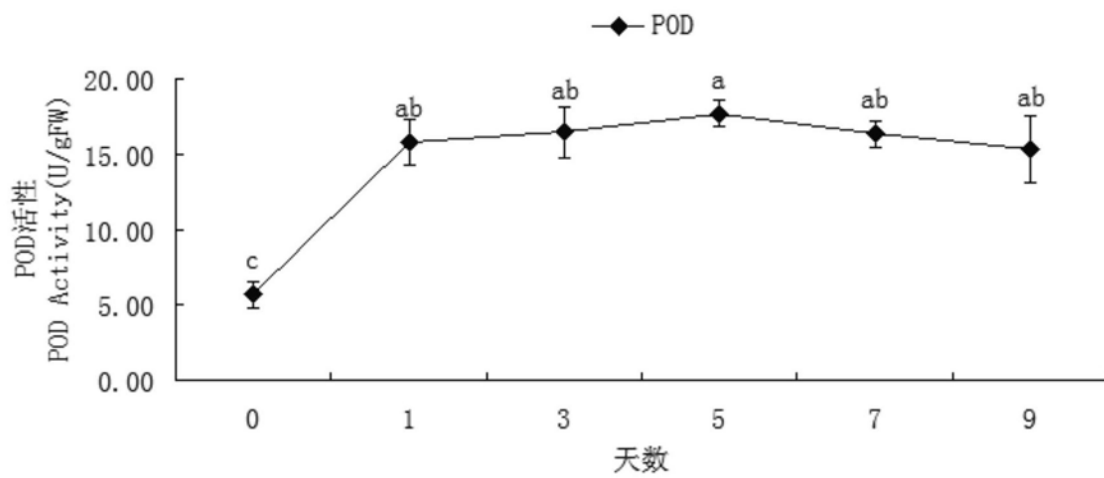


图5

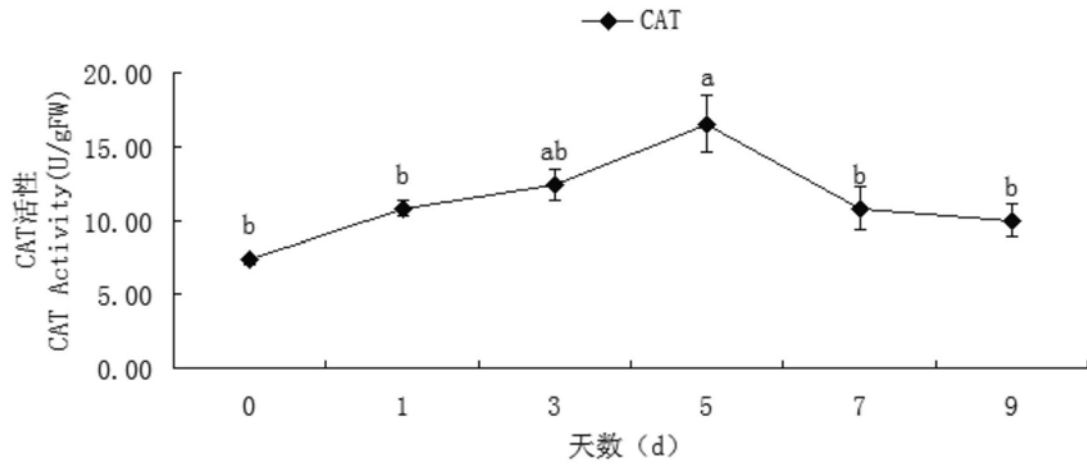


图6

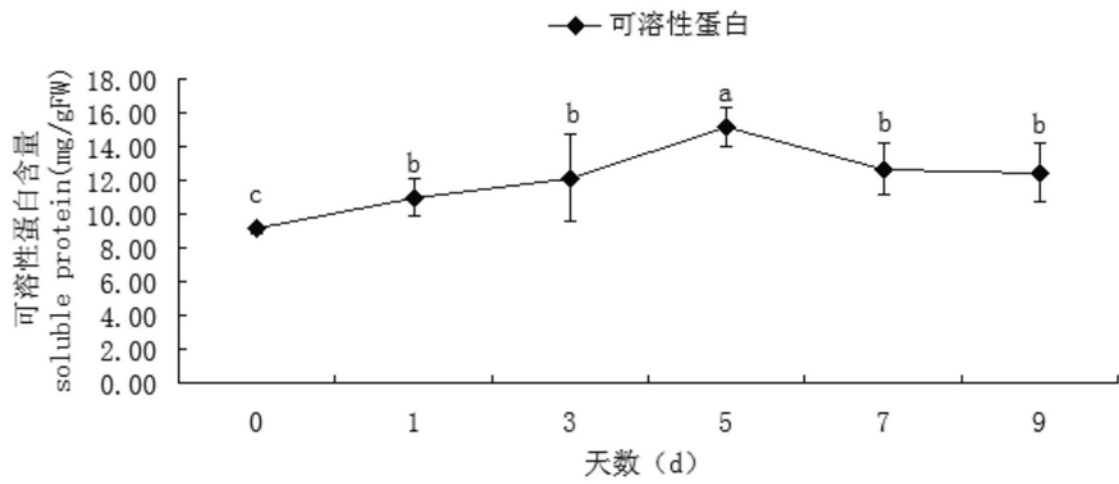


图7

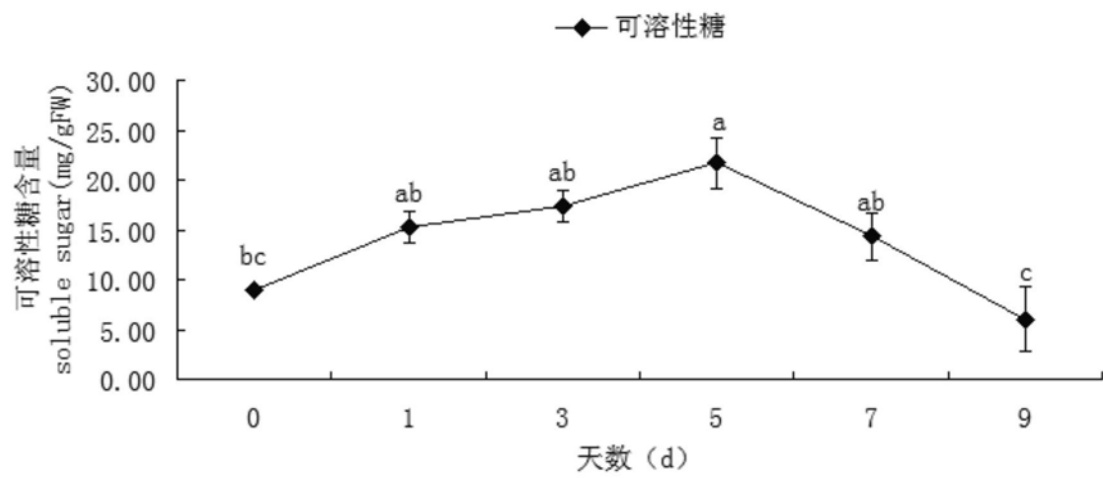


图8

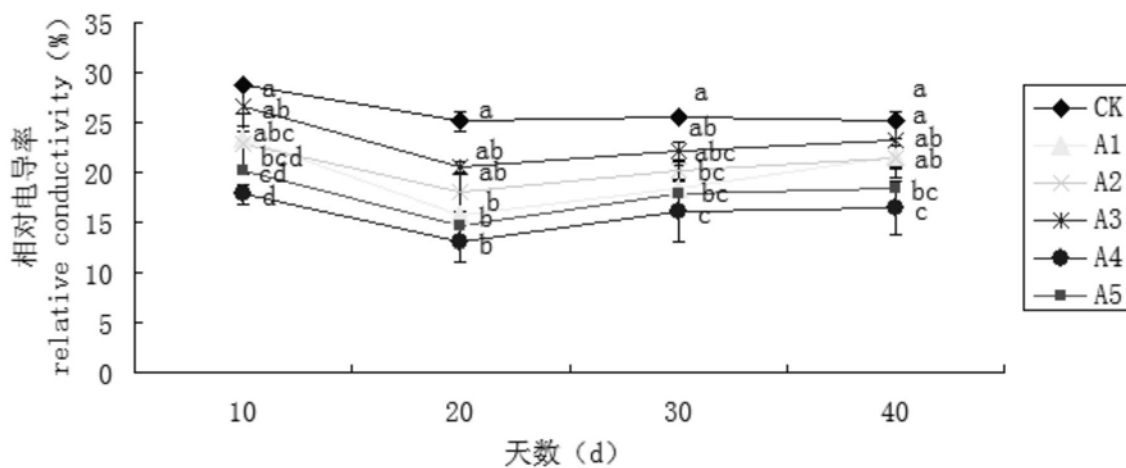


图9

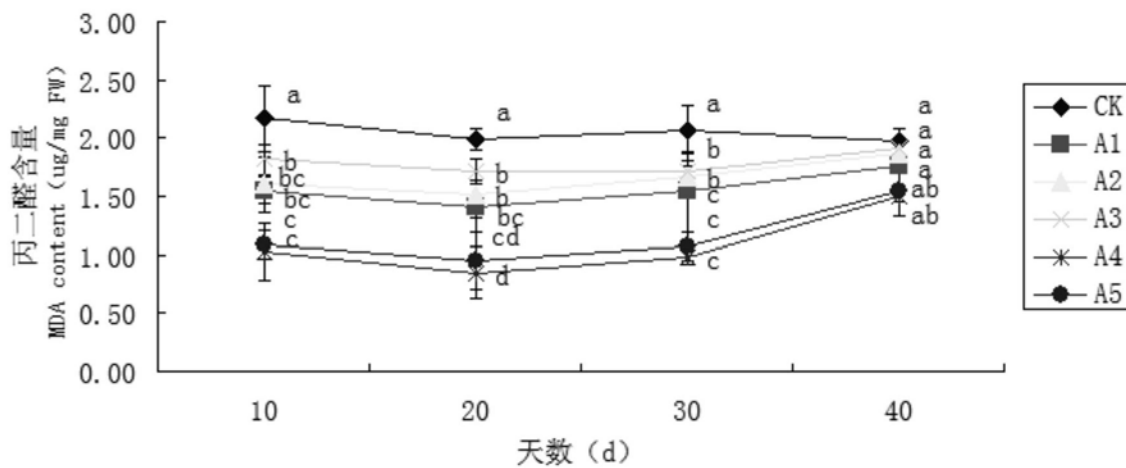


图10

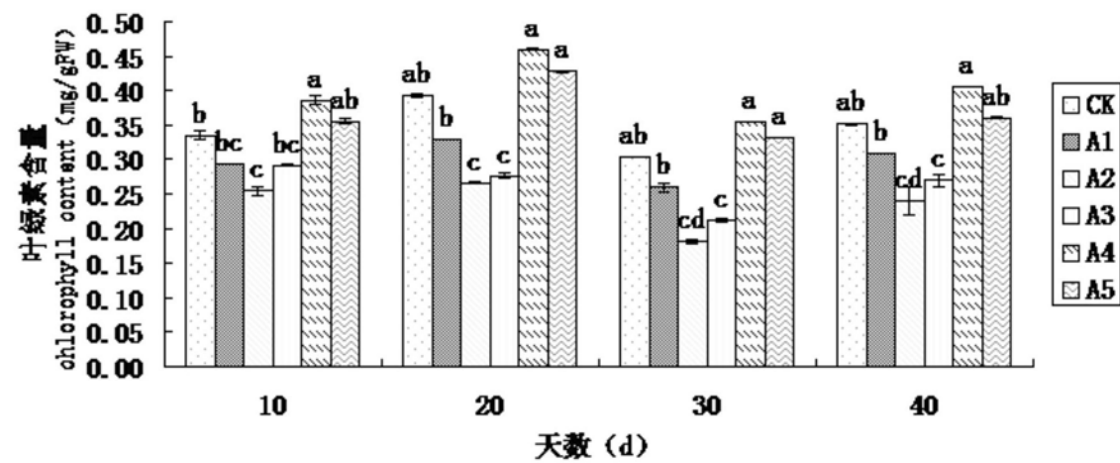


图11

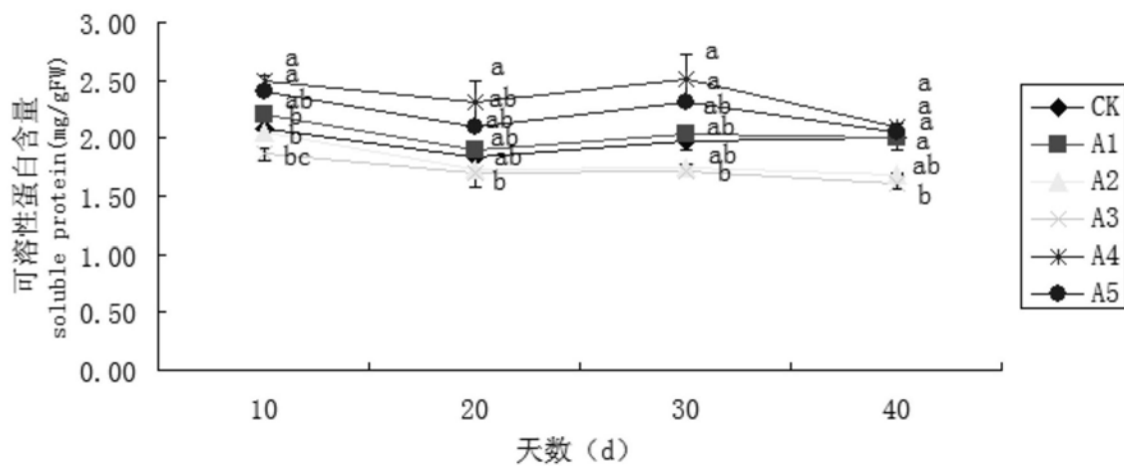


图12

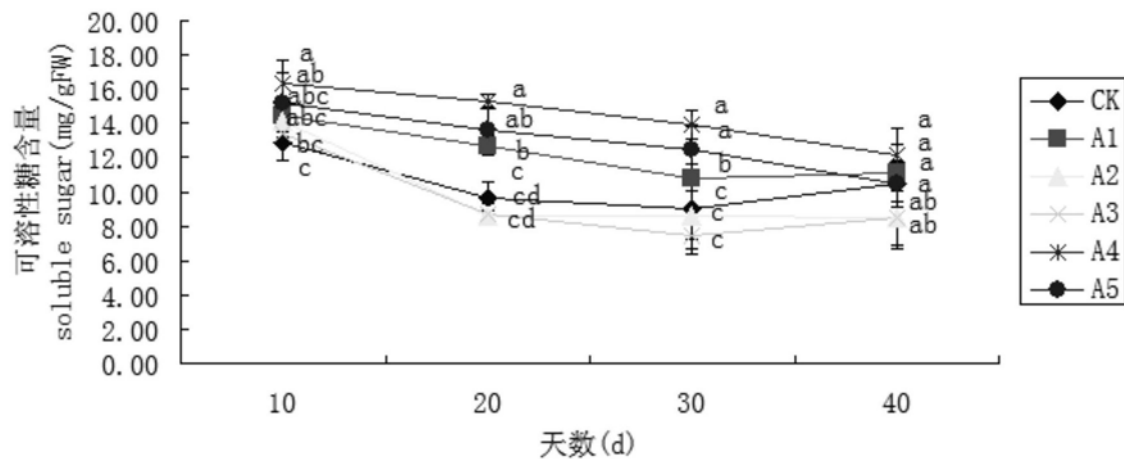


图13

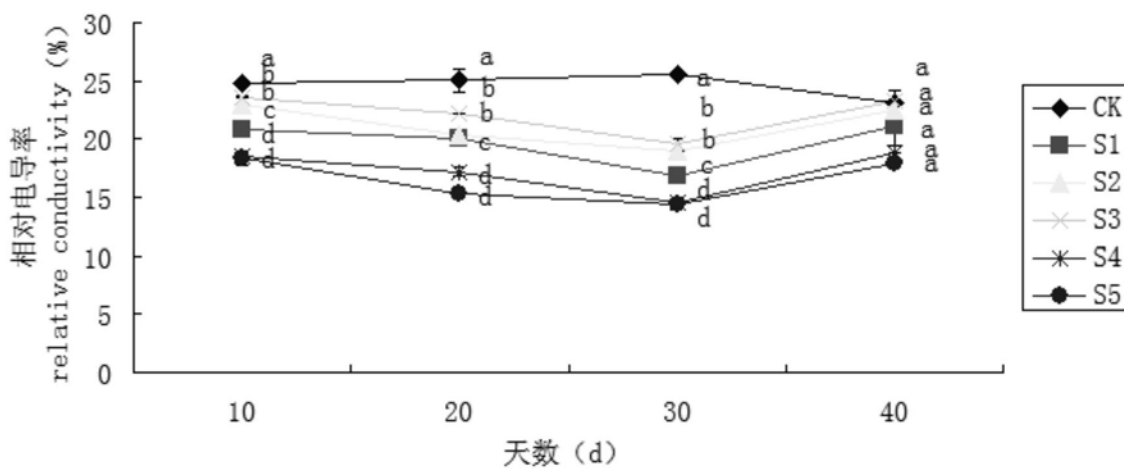


图14

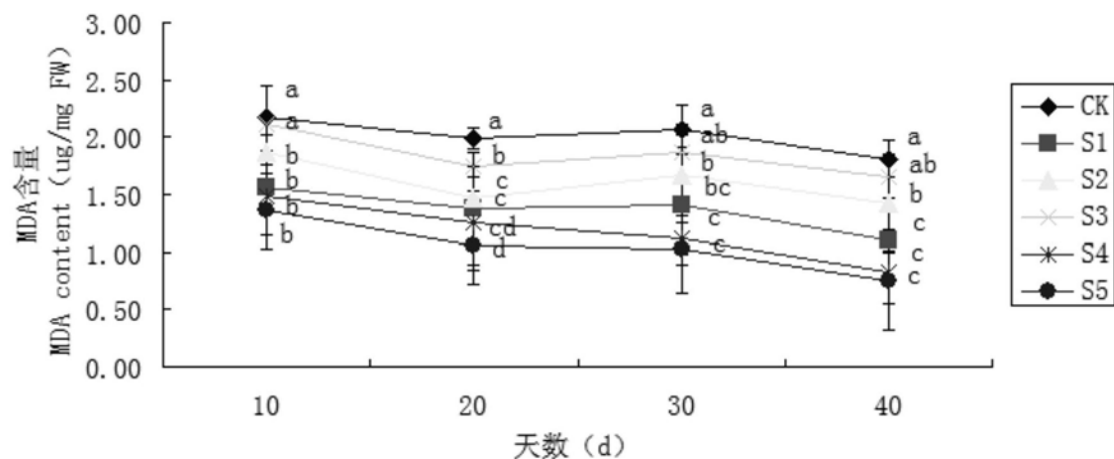


图15

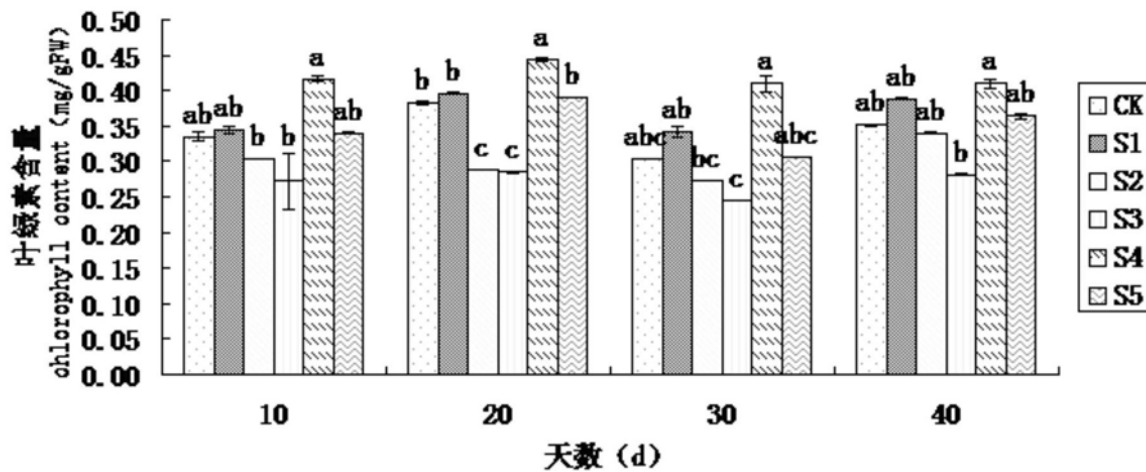


图16

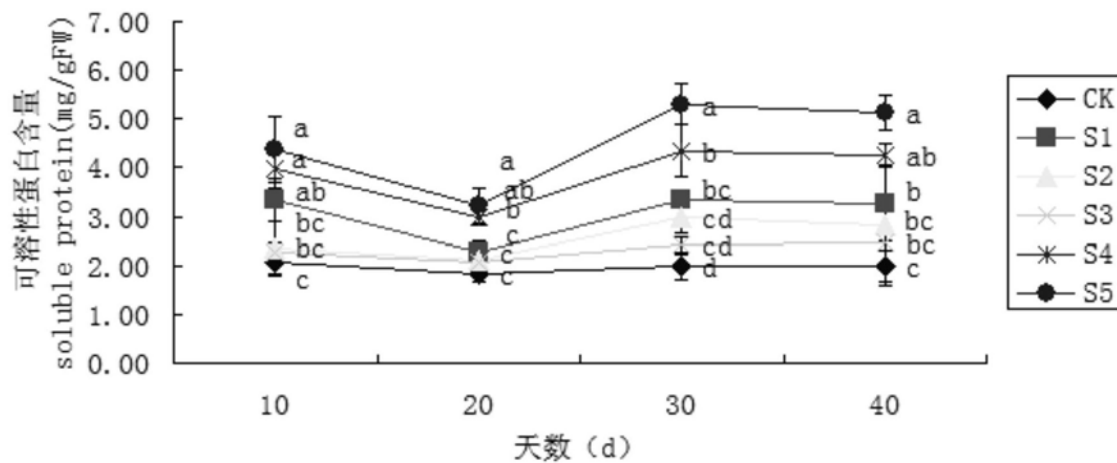


图17

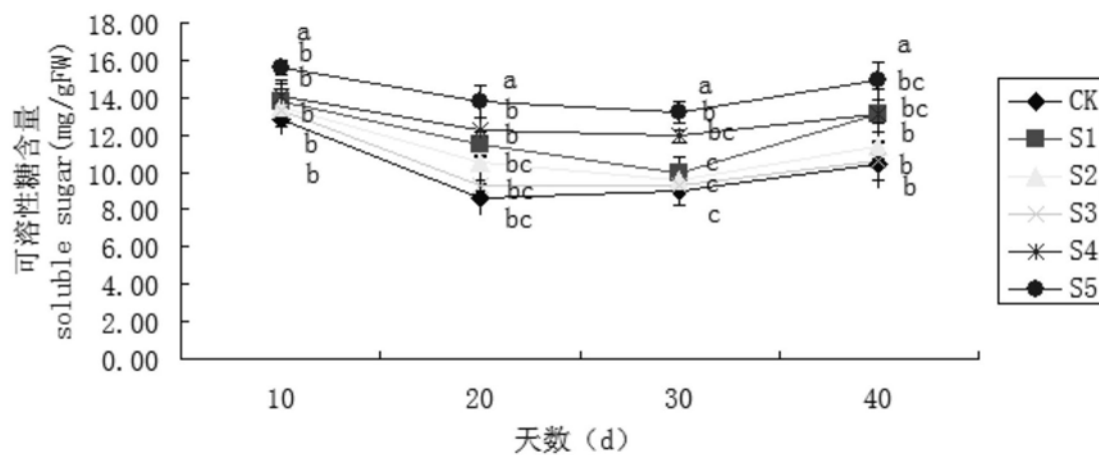


图18

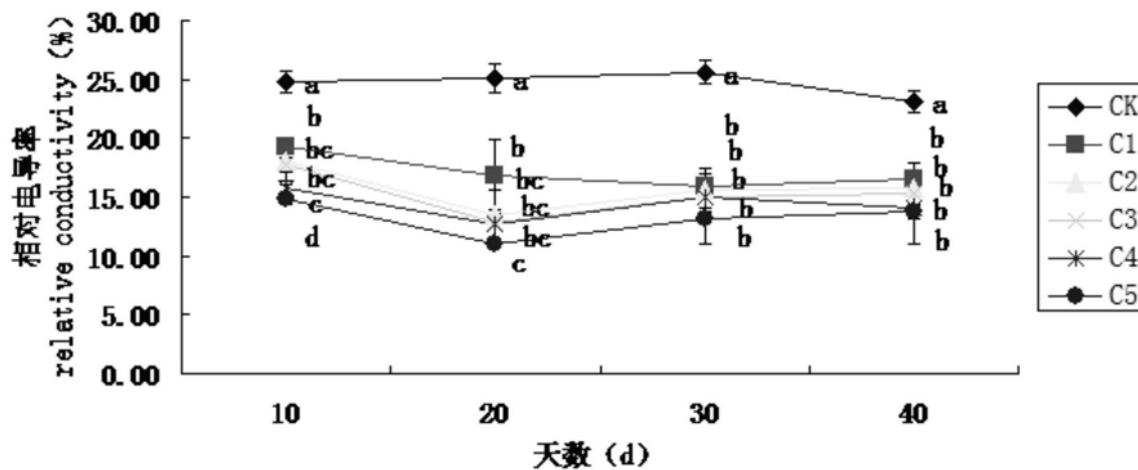


图19

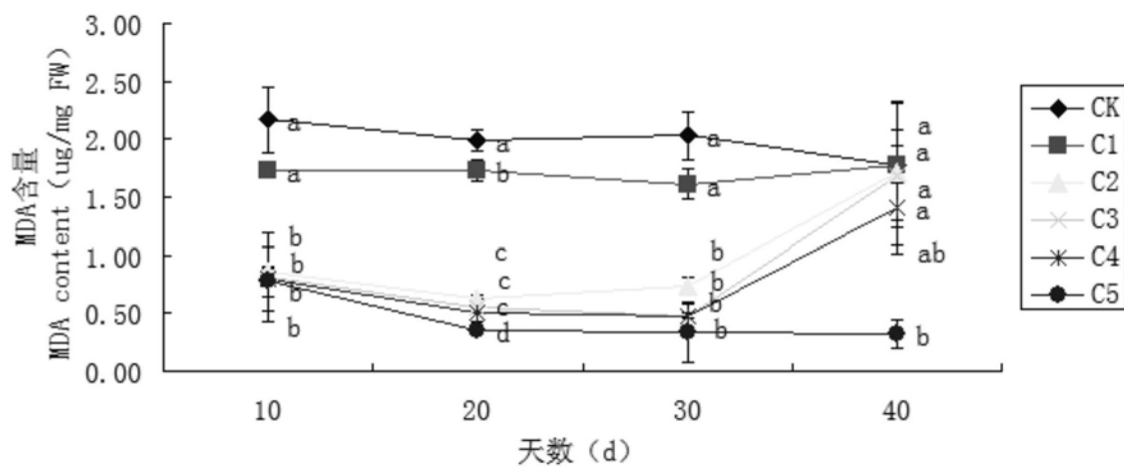


图20

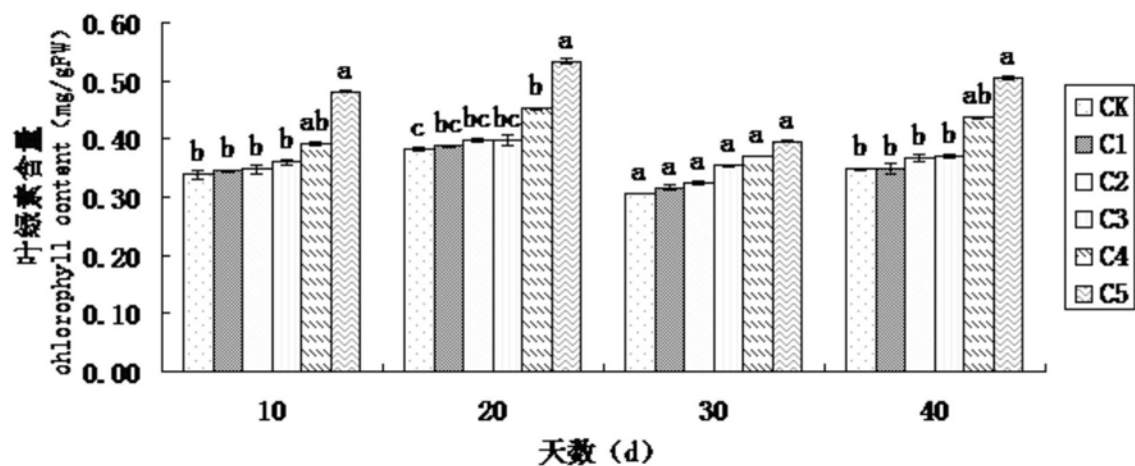


图21

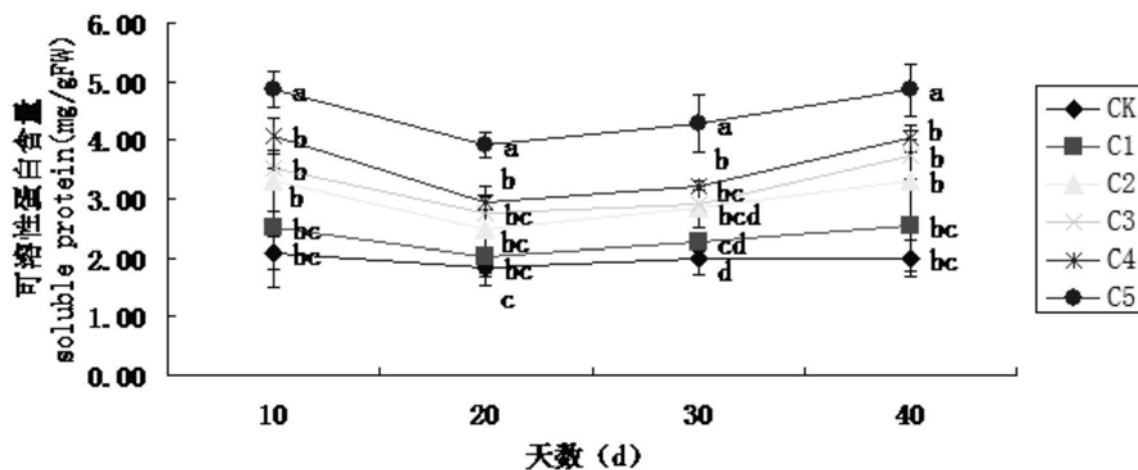


图22

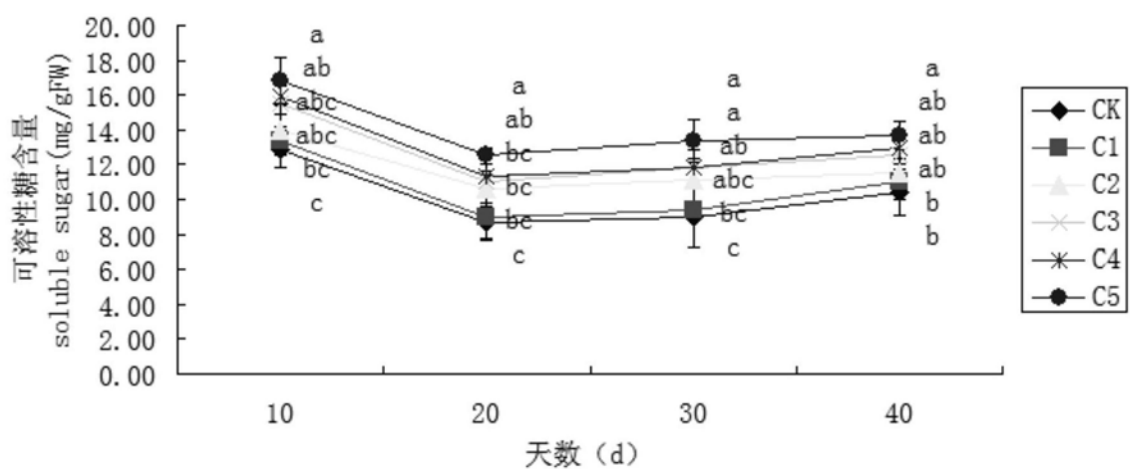


图23