

朱红芳,李晓锋,吴轩,等.不同温度对紫色不结球白菜生理生化指标的影响[J].上海农业学报,2020,36(6):33-38

不同温度对紫色不结球白菜生理生化指标的影响

朱红芳,李晓锋,吴轩,臧晓韵,朱玉英*

(上海市农业科学院设施园艺研究所,上海市设施园艺技术重点实验室,上海 201106)

摘要:以紫色不结球白菜品种‘紫艺’为试验材料,利用人工气候箱,采用盆栽法研究不同温度(5℃、25℃和35℃)处理对其脯氨酸含量、活性氧含量、抗氧化酶活性和抗坏血酸循环系统的影响。结果表明:在5℃低温条件下,随着处理时间的延长,‘紫艺’的脯氨酸和H₂O₂含量、SOD、CAT、APX和GR活性呈逐渐升高的趋势,O₂^{·-}产生速率、AsA和GSSG含量先增后减,而POD活性和GSH含量则持续下降;在35℃高温条件下,H₂O₂和GSSG含量、POD和APX活性呈上升趋势,脯氨酸含量、O₂^{·-}产生速率、SOD、CAT和GR活性先增后减,而AsA和GSH含量持续降低;在适宜的25℃条件下,植株的各个指标均比较平稳,变化不大。试验表明:高温和低温均会诱导紫色不结球白菜体内活性氧的增加,抗氧化酶系统和谷胱甘肽循环系统发生响应,促使植物提高响应温度变化胁迫的能力。

关键词:紫色不结球白菜;温度;活性氧;抗氧化酶;‘紫艺’

中图分类号:S634.01 文献标志码:A 文章编号:1000-3924(2020)06-033-06

Effects of different temperatures on physiological and biochemical indexes of purple pakchoi

ZHU Hongfang, LI Xiaofeng, WU Xuan, ZANG Xiaoyun, ZHU Yuying*

(Protected Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences;
Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201106, China)

Abstract: The effects of different temperature treatments (5℃, 25℃ and 35℃) on proline content, reactive oxygen species content, antioxidant enzyme activities and ascorbic acid cycle system of purple pakchoi ‘Ziyi’ were studied by pot experiment in an artificial climate box. The results showed that at 5℃, the content of proline and H₂O₂, the activities of SOD, CAT, APX and GR increased gradually with the extension of treatment time; The O₂^{·-} production rate, the content of ASA and GSSG increased first and then decreased, while POD activity and GSH content continued to decline. At 35℃, the content of H₂O₂ and GSSG, the activities of POD and APX increased, the proline content, the O₂^{·-} production rate and the activities of SOD, CAT and GR increased first and then decreased, while the content of ASA and GSH continued to decrease. Under the suitable 25℃ condition, all the indexes of the plant were relatively stable, and had little change. The test showed that both high temperature and low temperature could induce the increase of reactive oxygen species in purple pakchoi plants, and the antioxidant enzyme system and glutathione cycle system responded, which promoted the plant to improve the ability to respond to temperature change.

Key words: Purple pakchoi; Temperature; Reactive oxygen species(ROS); Antioxidant enzyme; ‘Ziyi’

温度是植物生长发育过程中的重要环境条件,对植物生长发育和蔬果贮存具有极大的作用。温度的高低不仅影响植物的生长,而且对植物体内的渗透物质、活性氧、抗氧化酶系统和抗坏血酸-谷胱甘肽循环

收稿日期:2019-05-05

基金项目:“十三五”重点研发计划(2017YFD0101803);上海市科委重点攻关项目(18391900700);上海市农委项目[沪农科种字(2017)第3-1-2]

作者简介:朱红芳(1980—),女,博士,副研究员,研究方向为不结球白菜遗传育种。E-mail:zhf334480@126.com

*通信作者,E-mail:yy5@saas.sh.cn,Tel:021-52235455

系统产生明显影响^[1]。低温胁迫常造成植物苗弱,植株生长缓慢且产量低、品质差^[2];而持续的高温胁迫则会使植物失水萎蔫,叶片枯黄脱落。研究发现,麻竹^[3]、大白菜^[4]、大豆^[5]和黄瓜^[6]的抗氧化酶系统在受到不同温度胁迫时会产生应激反应而活性增加。

不结球白菜(*Brassica rapa. ssp. chinensis*)属十字花科芸薹属白菜亚种,又名青菜、小白菜、油菜等,以嫩叶为产品,品质柔嫩、营养丰富,具有生长期短、适应性广的特点,在我国长江中下游及其以南地区受到人们的喜爱^[7]。不结球白菜是一种喜冷凉性蔬菜,适宜的生长温度为18—25℃,温度过低或过高均会对其产生一定的影响。紫色不结球白菜因富含高抗氧化的花青素而倍受青睐^[8],然而花青素极易受到温度、光照等环境因素的影响,在生产栽培过程中紫色不结球白菜叶片中花青素的积累受高温和低温的影响较大,冬季栽培中因低温而积累花青素,但生长缓慢,产量低下;在夏季高温栽培中则因高温花青素降解,造成紫色不结球白菜栽培品种外观色泽和品质不佳。在前期的试验中,本课题组发现5℃低温处理12 d后,紫色不结球白菜叶片紫色加深,呈深紫色,花青素含量显著增加,且蛋白质、糖类物质、抗坏血酸等营养品质提高,而在35℃高温处理12 d,花青素含量急剧降低,叶片呈绿色,品质降低^[9]。

本试验以紫色不结球白菜新品种‘紫艺’为材料,研究不同温度处理下其幼苗中蛋白质、脯氨酸等渗透物质含量,以及活性氧和抗氧化酶活性的变化,探索温度调控其生理生化的机制,以期紫色不结球白菜的种植栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为紫色不结球白菜新品种‘紫艺’,由上海市农业科学院设施园艺研究所青菜课题组选育。该品种直立性强,叶形椭圆,呈紫红色,表面平滑,有光泽,叶背面可见纵横交错的紫色叶脉,具有抗霜霉病和病毒病、耐寒性强、风味浓郁等特点。

1.2 试验方法

试验于2017年5—8月在上海市农业科学院设施园艺研究所温室内进行,种子播种于容积为15 cm × 10 cm × 10 cm的塑料营养钵中。待植株长到四叶一心时,选择生长势基本一致的试验用苗随机分成3组,放在人工气候培养箱内,以适宜温度25℃为对照,设定高温35℃和低温5℃处理,光照强度均为80 000 lx,湿度均为60%。分别在处理0 d、2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d时取样,不同处理选取5株大小一致的植株,每株选择离心叶第三片功能叶片,去掉叶柄,将叶片剪碎混匀,分装样品,测定相关指标。

1.3 指标测定

按照李合生^[10]的方法测定脯氨酸含量,采用硫代巴比妥酸法(TCA-TBA)测定丙二醛(MAD)含量,采用超氧根阴离子(O₂^{·-})对羟胺氧化方法测定O₂^{·-}产生速率。

抗氧化活性的测定:酶液的提取按照王爱国等^[11]的方法,提取液为0.05 mol/L、pH 7.8的PBS,含0.2 mmol/L EDTA和1% PVP(冰箱保存)。将0.1 g不结球白菜叶片置于预冷研钵中,分次加入预冷的提取液1.6 mL,冰浴下研磨成匀浆,放入离心管中,4℃低温下12 000 r/min离心20 min。上清液即为所需粗酶液,低温保存。采用氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性^[12];采用愈创木酚法测定过氧化物酶(POD)活性^[10];采用过氧化氢比色法测定过氧化氢酶(CAT)活性^[10],抗坏血酸氧化物酶(APX)活性按照Nakano等^[13]方法测定。

谷胱甘肽还原酶(GR)活性及还原性抗坏血酸(AsA)、还原性谷胱甘肽(GSH)和氧化性谷胱甘肽(GSSG)含量的测定参照郭欣欣等^[14]方法。

1.4 数据处理

采用Excel 2016和SPSS 20.0软件对试验数据进行处理,并用Origin 9.5软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同温度对紫色不结球白菜‘紫艺’脯氨酸含量的影响

脯氨酸以游离状态存在于细胞质中,可以保护细胞膜系统^[15]。由图1可见,在25℃条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’脯氨酸含量在51.38—54.91 μg/mL FW之间变动,平均值为53.06 μg/mL FW。当温度为

35 ℃时,脯氨酸含量呈先增后减的趋势,在8 d时达到最大值63.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FW,而后降至60.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FW。当温度为5 ℃时,脯氨酸含量持续上升,在12 d时达到最大值76.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FW,与0 d时相比,脯氨酸含量提高了31.20%。

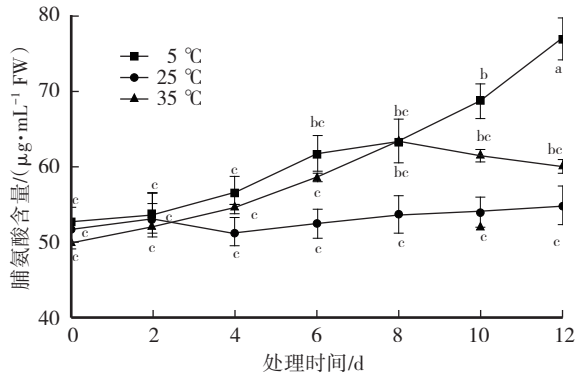


图1 不同温度处理对紫色不结球白菜脯氨酸含量的影响

Fig. 1 Effects of different temperature treatments on the proline content of purple pakchoi

2.2 不同温度对紫色不结球白菜‘紫艺’活性氧的影响

活性氧包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧根阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)等几种形式,其中 H_2O_2 是相对稳定的一种活性氧,也是一种有效的信号分子,植物在生长发育过程中受到胁迫时,可以通过 H_2O_2 提高免疫,增强植物对非生物胁迫的抵抗能力^[16]。在适宜的25 ℃条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’ H_2O_2 含量平均为6.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FW;在35 ℃条件下,从0 d到12 d, H_2O_2 含量呈缓慢增高趋势,在0—4 d和8—12 d增长较明显,4—8 d增长不明显。在5 ℃低温条件下,从0 d到12 d, H_2O_2 含量先增高后降低,在8 d时达到最大值11.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FW,随后缓慢下降(图2A)。

超氧阴离子作为生物体代谢过程中产生的一种自由基,具有很强的氧化性,可致组织损伤。在25 ℃条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’ $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率平均值为0.94 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$;在35 ℃高温下,从0 d到12 d, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率呈先增高后降低趋势,在8 d时达到最大值1.62 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$,12 d时 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率为1.34 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$;在低温5 ℃时, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率呈先增后减趋势,在10 d时达到最大值,12 d时为1.64 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ (图2B)。

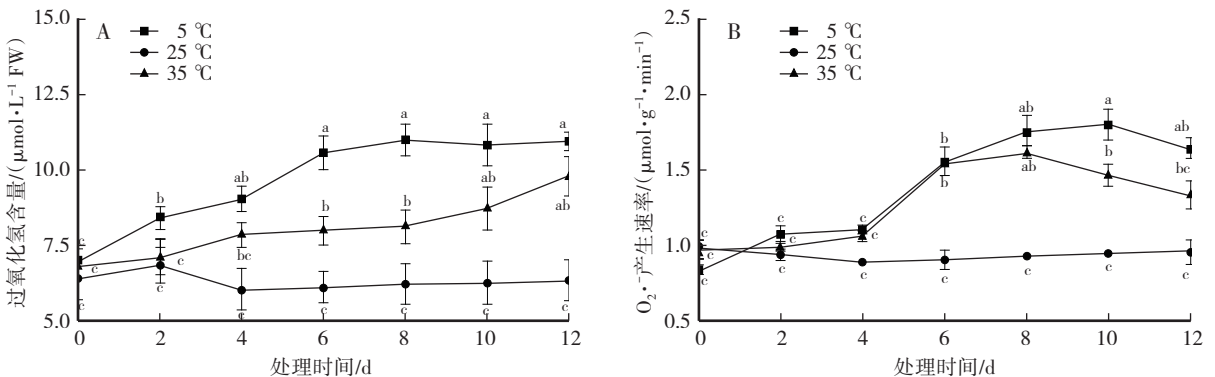


图2 不同温度处理对紫色不结球白菜 H_2O_2 含量和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率的影响

Fig. 2 Effects of different temperature treatments on the H_2O_2 content and $\text{O}_2^{\cdot-}$ production rate of purple pakchoi

2.3 不同温度对紫色不结球白菜‘紫艺’抗氧化酶活性的影响

过氧化物酶(POD)是一种高活性的氧化还原酶,与植物呼吸、光合作用、生长素的氧化和木质素的形成有关,其活性随植物生长发育和环境条件的变化而变化。在适宜的25 ℃条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’POD活性平均值为8.61 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW,变化不显著;在5 ℃时,POD活性呈现缓慢增长的趋势,从0 d到12 d,POD活性由8.52 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW增长至9.68 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW,增加了13.62%;在35 ℃时,从0 d到12 d,POD活性呈持续下降趋势,且在8—10 d迅速下降,从7.66 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW降至6.52 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW(图3A)。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种抗氧化金属酶,具有特殊的生理活性,能够清除生物体内的有害自由基。在

25 °C条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’SOD活性平均值为113.36 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW;在35 °C条件下,SOD活性呈先增后降趋势,从0 d到10 d持续升高,在10 d时到达最大值190.25 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW,之后下降;低温5 °C时,SOD活性随时间逐渐增强,从0 d的111.25 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW增加到12 d的176.11 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW(图3B)。

过氧化氢酶(CAT)是一种末端氧化酶,其生物学功能是催化过氧化氢在细胞内分解为过氧化氢和氧气,并抑制过氧化氢形成有害的 $\cdot\text{OH}$ 。在25 °C条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’CAT的活性平均值为59.98 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW;在35 °C条件下,从0 d到12 d,CAT活性呈先增后减的趋势,在8 d时到达最高的137.35 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW,12 d时CAT活性为116.96 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW;在低温5 °C时,CAT活性随时间缓慢增强,从0 d到12 d,CAT活性由58.14 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW增加至88.14 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW(图3C)。

抗坏血酸过氧化物酶(APX)是清除植物体内活性氧和抗坏血酸代谢的关键抗氧化酶之一。APX通过 H_2O_2 催化氧化,消耗AsA。在25 °C条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’APX活性平均值为0.52 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW;在高温35 °C时,从0 d到12 d,APX活性呈先增后减的趋势,在6 d时达最高的0.84 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW,12 d时APX活性为0.66 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW;在低温5 °C下,APX活性随时间逐渐增强,从0 d的0.53 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW增加到12 d的1.98 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ FW(图3D)。

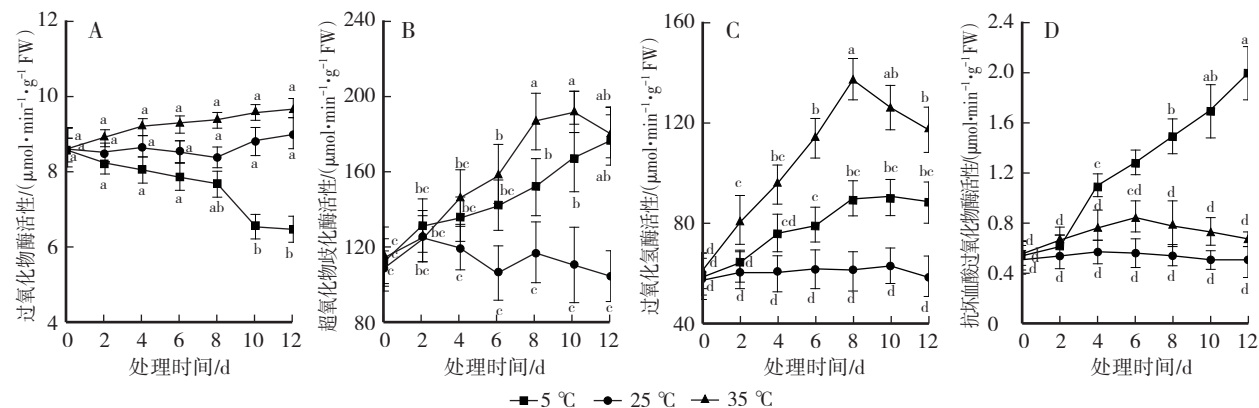


图3 不同温度处理对紫色不结球白菜 POD、SOD、CAT 和 APX 活性的影响

Fig. 3 Effects of different temperature treatments on the activities of POD, SOD, CAT and APX of purple pakchoi

2.4 不同温度对紫色不结球白菜‘紫艺’抗坏血酸-谷胱甘肽的影响

抗坏血酸又称维生素C,AsA为还原型抗坏血酸,是衡量农作物产品品质的重要指标之一。在25 °C条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’AsA含量平均值为480.77 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW,在445.45—517.64 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW之间变动;在5 °C低温下,AsA含量先降低后增加,从0 d的430.86 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW先降低至415.88 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW后,再增加至12 d的623.53 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW;在35 °C高温下,AsA含量从0 d的438.77 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW逐渐降低,12 d时AsA含量降为403.14 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW(图4A)。

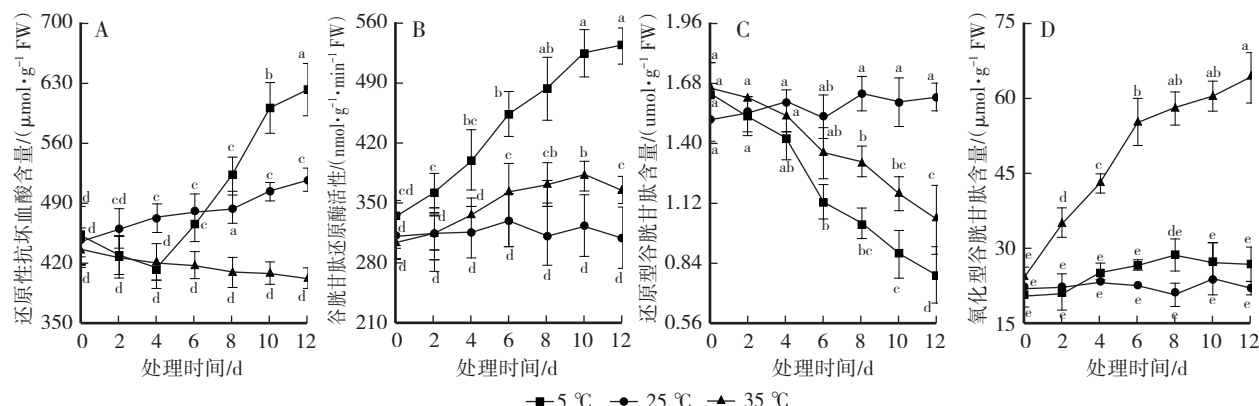


图4 不同温度处理对紫色不结球白菜 AsA 含量、GR 活性、GSH 和 GSSG 含量的影响

Fig. 4 Effects of different temperature treatments on the GR activity, content of ASA, GSH and GSSG of purple pakchoi

谷胱甘肽还原酶(GR)是一种将氧化型谷胱甘肽还原成还原型谷胱甘肽的黄素蛋白氧化还原酶。在25℃条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’GR活性平均值为312.33 nmol/(g·min) FW,在305.52—325.75 nmol/(g·min) FW之间变动;在5℃低温时,GR活性随时间逐渐增加,从0 d到12 d,GR活性由330.64 nmol/(g·min) FW增加至530.64 nmol/(g·min) FW;在35℃高温下,GR活性呈先增后减的趋势,从301.44 nmol/(g·min) FW延长缓慢增加至10 d时的379.24 nmol/(g·min) FW,随后下降(图4B)。

还原型谷胱甘肽(GSH)具有抗氧化和抗御各种外源胁迫,以及清除过量活性氧和维持细胞内氧化还原平衡的功能。在25℃条件下,从0 d到12 d,‘紫艺’GSH含量平均值为1.57 μmol/g FW,在1.50—1.63 μmol/g FW之间变动;在5℃条件下,GSH含量逐渐降低,从1.63 μmol/g FW降低至0.78 μmol/g FW;在35℃条件下,GSH含量从1.65 μmol/g FW逐渐降低为1.04 μmol/g FW(图4C)。

氧化谷胱甘肽(GSSG)在还原型谷胱甘肽和谷胱甘肽还原酶共存的情况下对自由基清除具有协同催化作用,GSH/GSSG值对自由基清除率有明显的影响。在25℃条件下,从0 d至12 d,‘紫艺’GSSG含量在23.88—20.65 μmol/g FW之间变动,平均值为22.32 μmol/g FW;在5℃条件下GSSG含量先增加后降低,由20.58 μmol/g FW增加至8 d的28.54 μmol/g FW,12 d时降低为26.77 μmol/g FW;在35℃条件下,GSSG含量从24.23 μmol/g FW逐渐增加至64.16 μmol/g FW(图4D)。

3 讨论与结论

温度的变化在一定程度上刺激了植物细胞膜,导致细胞膜中不饱和酸、活性氧和脯氨酸含量增加。本试验中紫色不结球白菜叶片中脯氨酸含量在低温条件下呈上升趋势,在高温下呈先增后减趋势, H_2O_2 在低温和高温胁迫下均呈现上升趋势, $O_2^{\cdot-}$ 在低温和高温下均呈现先增后减的趋势,这与宁露云等^[17]和寇刚^[18]研究一致。

低温胁迫刺激组织、细胞的抗氧化系统,抗氧化酶活性增强或降低,从而提高组织、细胞抵御低温胁迫的能力^[19]。在高温胁迫下,随着SOD活性的下降,白菜中POD活性却逐渐增加,而过氧CAT活性则出现先下降后上升的变化^[20]。本试验中紫色不结球白菜叶片中POD活性在低温下呈下降趋势,高温下则呈上升趋势;SOD和CAT活性在低温和高温下变化趋势一致,在低温下均逐渐升高,在高温下则先升后降;APX活性在低温下逐渐增加,在高温下呈先增后减趋势,这与黄瓜^[21]和番茄^[22]研究结果一致。由于APX是植物AsA的主要消耗者,因此AsA含量变化依据APX活性的强弱变化,两者呈一定的负相关性。谷胱甘肽还原酶以还原型辅酶II为唯一的还原力和电子供体催化还原型谷胱甘肽从氧化型谷胱甘肽中还原。在温度的影响下,GR活性增加,GSSG含量增加,而GSH含量下降。本试验中AsA含量在低温下先增后降,在高温下呈下降趋势;GR含量在低温下呈上升趋势,在高温下呈先增后降趋势;GSH含量在低温和高温下持续下降;GSSG含量在低温下呈先增后减趋势,在高温下持续增加,这与张腾国等^[23]的研究一致。

综上所述,通过在不同温度条件下对紫色不结球白菜生理生化指标的测定和分析,发现高温和低温均会诱导不结球白菜植物体内活性氧增加,使抗氧化酶系统和谷胱甘肽循环系统产生应激反应,从而提高植物抵抗温度变化的胁迫能力。本研究明确了紫色不结球白菜受温度影响下生理生化机制的调节,可为紫色不结球白菜的栽培种植提供一定参考。

参 考 文 献

- [1] 许英,陈建华,朱爱国,等. 低温胁迫下植物响应机理的研究进展[J]. 中国麻业科学,2015,37(1):40-49.
- [2] 江福英,李延,翁伯琦. 植物低温胁迫及其抗性生理[J]. 福建农业学报,2002,17(3):190-195.
- [3] 张玮,黄树燕,吴继林,等. 低温胁迫对麻竹叶片和根系抗性生理指标的影响[J]. 生态学杂志,2012,31(3):513-519.
- [4] 赵美华,赵军良. 高温对大白菜幼苗生理指标的影响[J]. 山西农业科学,2014,42(10):1071-1074.
- [5] 李佳佳,郑双雨,孙根楼,等. 大豆响应高温胁迫的生理和分子遗传机理研究现状与展望[J]. 中国农业科学,2017,50(14):2670-2682.
- [6] 方媛,张亚红,王丽慧,等. 低温胁迫对三个黄瓜品种幼苗生理生化特性的影响[J]. 北方园艺,2016(17):30-36.
- [7] 侯喜林,宋小明. 不结球白菜种质资源的研究与利用[J]. 南京农业大学学报,2012,35(5):35-42.
- [8] 朱红芳,李晓锋,朱玉英,等. 不结球白菜紫色叶片花青素相对含量的遗传分析[J]. 中国农学通报,2014,30(31):141-146.

- [9] 朱红芳,李晓锋,朱玉英. 温度对紫色不结球白菜外观和营养品质的影响[J]. 西北植物学报,2019,39(2):83-91.
- [10] 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.
- [11] 王爱国,罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯,1990(6):55-57.
- [12] 于孝保,朱继宏,付德峰,等. 4种蔬菜中 SOD 活性测定研究[J]. 现代农业科技,2012(11):82.
- [13] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts [J]. Plant & Cell Physiology,1981,22(5):867-880.
- [14] 郭欣欣,李晓锋,朱红芳,等. 淹水胁迫对不结球白菜抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 植物生理学报,2015,51(12):2181-2187.
- [15] 司家钢,孙日飞,吴飞燕,等. 高温胁迫对大白菜耐热性相关生理指标的影响[J]. 中国蔬菜,1995,1(4):4-6.
- [16] 吉振勇,张焯,张正锋,等. 高温胁迫对二、四倍体不结球白菜五个生理生化指标的影响[J]. 上海蔬菜,2006(4):29-31.
- [17] 宁露云,包满珠,张蔚. 低温胁迫对矮牵牛 H 株系花青素、游离脯氨酸及可溶性糖含量的影响[J]. 湖北农业科学,2016,55(6):1500-1503.
- [18] 寇刚. 变温胁迫下外源物质对山定子叶片生理功能影响的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [19] 郑国华,张贺英,钟秀容. 低温胁迫下枇杷叶片细胞超微结构及膜透性和保护酶活性的变化[J]. 中国生态农业学报,2009,17(4):739-745.
- [20] 李晓锋,朱玉英,侯瑞贤,等. 夏季高温对大白菜不同发育期生化特性的影响研究[J]. 上海农业学报,2008,24(1):36-39.
- [21] 孙艳,徐伟君. 高温胁迫对不同黄瓜品种幼苗中抗坏血酸代谢的影响[J]. 西北农业学报,2007,16(6):164-169.
- [22] 赵云霞,于贤昌,李超汉,等. 高低温胁迫对番茄叶片抗坏血酸代谢系统的影响[J]. 山东农业科学,2010(4):22-26.
- [23] 张腾国,聂亭亭,孙万仓,等. 逆境胁迫对油菜谷胱甘肽还原酶基因表达及其酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2018,29(1):213-222.

(责任编辑:闫其涛)