

外源褪黑素对高温胁迫下甘蓝幼苗生理特性的影响

曾庆栋, 许忠民, 张恩慧, 郭佳, 李升娟

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以甘蓝品种“秦甘58”为试材,对甘蓝叶片喷施不同浓度褪黑素(MT),研究了外源褪黑素预处理对高温胁迫下甘蓝幼苗各项生理指标的影响。结果表明:外源MT预处理能够降低高温对甘蓝幼苗叶片中叶绿素含量的影响,外源MT预处理能显著降低高温胁迫下甘蓝幼苗叶片相对电导率、丙二醛(MDA)含量,增加可溶性蛋白质含量和增强叶片中超氧化物歧化酶(SOD)活性。说明MT预处理能够减弱高温胁迫对甘蓝幼苗光合(叶绿素)的影响,减少电解质的外渗,保护脂膜的完整性,能降低高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片的细胞膜脂质过氧化水平,提高相关抗氧化酶的活性,缓解高温对甘蓝幼苗的伤害,提高甘蓝幼苗对高温胁迫的抵御能力。

关键词:褪黑素;预处理;高温胁迫;甘蓝幼苗;生理特性

中图分类号:S 635.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)20-0012-06

褪黑素(Melatonin, MT),化学名称为N-乙酰基-5-甲氧基色胺,是一种吲哚类色胺。褪黑素早期研究主要集中在动物体,是一种动物激素,主要参与脊椎动物的昼夜节律和光周期反应等生理调节,通常用于调整由于睡眠失调和飞行时差引起的生物钟紊乱,治疗神经衰弱、改善睡眠^[1]。褪黑素具有亲脂和亲水双重性质,因此可以在细胞内自由运动,从而维持膜的完整性,减轻不良环境

对细胞造成的伤害。DUBBELS等^[2]研究发现,褪黑素在植物中普遍存在,在植物体中褪黑素有多种生理功能,对提高真菌和高等植物对环境的耐受性、调节植物光周期、保护叶绿素等方面均具有作用。通过对褪黑素的深入研究,JANAS等^[3]发现在植物体内褪黑素含量虽然含量较低,但在生理调节、增强抗逆性方面等均有重要作用,同时能缓解温度变化等逆境对植物伤害。

王英利等^[4]研究发现,褪黑素是植物体内的一种保护性抗氧化剂,对绿豆幼苗进行褪黑素预处理,能减缓UV-B辐射引起的氧化胁迫作用。当外界环境温度较高,对黄瓜幼苗喷施外源褪黑素,既能增加抗氧化酶相关基因表达,也能通过减少生物大分子的降解来提高抗氧化酶活性和保护细胞膜的完整性;褪黑素不但提高了脱氧抗坏血酸还原酶、单抗坏血酸还原酶和谷胱甘肽还原酶的活性,而且增强了植物热胁迫的抵抗能力^[5]。

甘蓝是我国主要蔬菜作物,具有重要的经济价值和食用价值。甘蓝起源于地中海沿岸,喜冷

第一作者简介:曾庆栋(1990-),男,硕士研究生,研究方向为甘蓝种质资源与遗传育种。E-mail: qingdongzeng@sinacn.com

责任作者:许忠民(1971-),男,博士,副研究员,现主要从事甘蓝种质资源与遗传育种等研究工作。E-mail: xuzhongmin2003@126.com

基金项目:“十三五”国家重点研发计划资助项目(2016YFD0101702);国家大宗蔬菜产业技术体系资助项目(CARS-25);杨凌产学研用协同创新重大资助项目(2016CXY-10)。

收稿日期:2017-07-10

凉,秋甘蓝育苗时间在6—7月,幼苗期正值夏季高温,热胁迫会使甘蓝幼苗的生长受到抑制或造成徒长。高温对甘蓝的生长发育有直接的影响,温度过高会导致越夏甘蓝的结球质量低,烂球率高,产量下降。而秋冬甘蓝的育苗季节正值夏季,高温导致幼苗生长不良,抗逆性弱,严重影响后期的产量和品质。高温对甘蓝的生产也有间接的影响,对南方夏季而言,高温常伴随着高湿,以至于软腐病、黑腐病、底腐病、霜霉病等大量发生^[6]。

近年来,我国甘蓝栽培面积逐年增加且呈上升趋势^[7],但是夏季的高温天气及温室效应加剧带来的短期异常高温严重影响了结球甘蓝的产量和品质。因此,在甘蓝生产上进行耐热性研究以及培育耐高温品种具有一定的实际意义。但在甘蓝中,褪黑素是否能提高幼苗耐高温能力,最适浓度为多少尚鲜见报道。该试验以甘蓝幼苗“秦甘58”品种为试材,通过对叶片喷布不同浓度外源MT,研究温度胁迫处理对甘蓝幼苗叶片中叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、相对电导率、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性等生理指标的影响,进一步探明褪黑素对植物抵抗高温逆境方面的生理作用,也为褪黑素在甘蓝生产中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试甘蓝品种为“秦甘58”,7月1日播种于装有蔬菜专用基质50孔穴盘中,每穴播2粒种子,随后将穴盘放置在光照培养箱中,培养条件为:昼/夜光周期14 h/10 h,光照强度20%(6 600 lx),昼/夜温度22℃/15℃,相对湿度80%。7月7日幼苗出土,光照强度增至100%(33 000 lx),昼/夜相对湿度70%/75%,11日剔除多余幼苗,补齐缺苗,每穴留1株。

1.2 试验方法

甘蓝幼苗生长至4~5片叶子时,选择长势整齐一致的幼苗用浓度为0(蒸馏水,CK)、25、50、100、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源MT于20:00喷于甘蓝叶片,以叶片滴水为度,每个处理50株,每穴1株,

设3次重复。隔3 d喷1次,共喷5次,以使甘蓝幼苗充分吸收MT。最后一次喷施MT后3 d,将幼苗放入光照培养箱对其进行高温胁迫处理,昼/夜温度40℃/30℃,昼/夜光周期14 h/10 h,相对湿度85%。处理0、24、48 h时采集第4片叶,测定叶片叶绿素含量和相对电导率,其它部分样品用液氮速冻,超低温冰箱(-70℃)环境中保存,用于测定其它各项生理指标。

1.3 项目测定

叶绿素含量用SPAD-502叶绿素测定仪测定;电导率采用电导率仪测定,取完整的甘蓝幼苗叶片,用蒸馏水冲洗3次,放在滤纸上,吸干表面水分,将叶片剪成长条,快速称取鲜样3份,每份0.1 g,将称量后的叶片分别置于10 mL去蒸馏水的刻度试管中,塞上玻璃塞。浸泡处理12 h(室温)后,用电导率仪测定试管内浸提液的电导率(R_1),然后将试管放入沸水浴加热30 min,冷却至室温后摇匀,再次测定浸提液电导率(R_2)。相对电导率(%)= $R_1/R_2 \times 100$ ^[8-9]。丙二醛含量采用硫代巴比妥酸法测定,可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝G-250染色法测定^[10],SOD活性采用NBT光还原法测定。

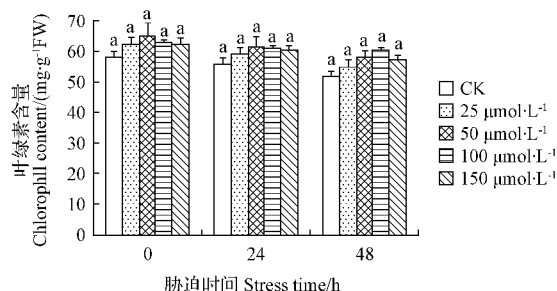
1.4 数据分析

所得数据采用Excel软件处理后,采用DPS 9.5统计分析软件进行方差分析,并用邓肯氏新复极差测验法对不同浓度处理间进行多重比较,并采用Excel 2003软件作图。

2 结果与分析

2.1 外源褪黑素对高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片中叶绿素含量的影响

光合作用的强弱与光合色素含量息息相关,由图1可知,甘蓝幼苗叶片的叶绿素含量随着胁迫时间延长有所降低,经褪黑素预处理的甘蓝幼苗叶片的叶绿素随胁迫时间延长也逐渐降低,各处理间差异均不显著,但经褪黑素预处理的叶绿素含量在胁迫后均高于对照。表明喷施褪黑素提高了甘蓝幼苗叶片的叶绿素含量,同时提高了甘



注:不同小写字母表示同一胁迫时间内不同浓度褪黑素处理之间的差异达到 0.05 显著性水平。下同。

Note: Different lowercase letters indicate in the same stress time significant difference among different MT treatments at 0.05 level. The same blow.

图1 外源 MT 预处理对高温胁迫下甘蓝幼苗叶片叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effects of melatonin pretreatment on chlorophyll content in leaves of cabbage seedling under high temperature stress

蓝幼苗叶片叶绿素的稳定性,是对逆境适应的一种表现,保证光合作用的进行。

2.2 外源褪黑素对高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片相对电导率的影响

从图 2 可以看出,甘蓝幼苗叶片的相对电导率逐渐增大,说明高温破坏了细胞膜的完整性,导致膜透性增加。随着高温胁迫时间的延长,叶片相对电导率增加的幅度也在上升,对照和 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 处理增幅较大,其它均

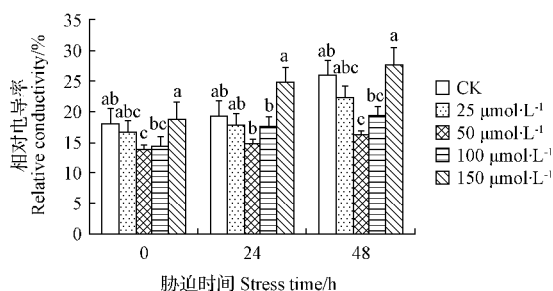


图2 外源 MT 预处理对高温胁迫下甘蓝幼苗叶片相对电导率的影响

Fig. 2 Effects of melatonin pretreatment on relative conductivity in leaves of cabbage seedling under high temperature stress

低于对照,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 处理可能浓度过高,对幼苗膜结构已经造成伤害,因此相对电导率较高。0、48 h 处理时间,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 处理的甘蓝幼苗膜相对电导率与对照差异显著,分别比对照下降 23.33%、37.45%。当浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 预处理经胁迫后叶片相对电导率均最低,因而说明高温胁迫下 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 预处理甘蓝幼苗叶片效果最好,对膜结构的损害减小,从而使膜透性降低。

2.3 外源褪黑素对高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量的影响

随着高温胁迫处理时间的延长,甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量出现先上升后下降的趋势(图 3)。当胁迫 24 h 时达到最大值,48 h 以后其含量下降。喷施褪黑素能明显提高高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量,在 0 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内,提高褪黑素浓度,叶片可溶性蛋白质含量也增加,在褪黑素预处理的浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,达到最高,以后随着褪黑素浓度的增加反而降低,但是仍高于对照(CK)。50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素预处理的甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量与对照均存在显著性差异,0 h 分别比 CK 增加 13.58%、35.02%,24 h 分别比 CK 增加 31.08%、48.32%,48 h 分别比 CK 增加 60.13%、102.04%。说明在高温胁迫条件下,喷施褪黑素

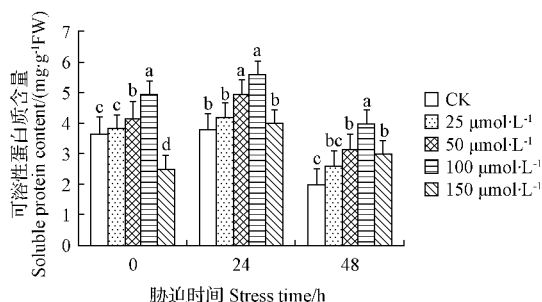


图3 外源 MT 预处理对高温胁迫下甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effects of melatonin pretreatment on soluble protein content in leaves of cabbage seedling under high temperature stress

能够促进甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量的增加,并能提高甘蓝幼苗协调物质代谢能力。

2.4 外源褪黑素对高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片丙二醛(MDA)含量的影响

植物遭遇逆境时,植物体内细胞膜质过氧化而产生有毒物质丙二醛。由图 4 可知,随着高温处理时间的延长,甘蓝幼苗叶片 MDA 含量在增加,在 48 h 增加幅度比较大。用 MT 处理的甘蓝幼苗,叶片 MDA 含量逐渐下降,均低于对照(CK)。24 h 时,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 处理的甘蓝幼苗叶片 MDA 含量与 CK 差异显著,比 CK 下降 20.18%。48 h 时,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 处理的甘蓝幼苗叶片 MDA 含量分别比 CK 下降 11.68% 和 13.80%。这说明 MT 预处理可减少高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片 MDA 含量的积累,从而降低了膜脂质过氧化水平,减轻了高温胁迫对甘蓝幼苗叶片细胞膜造成的伤害。

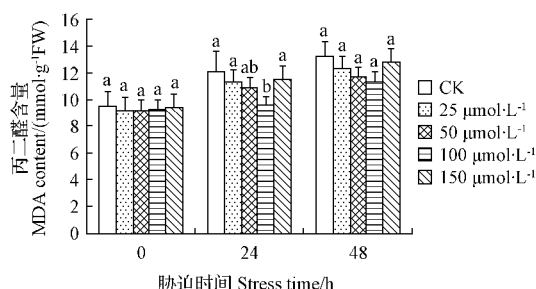


图 4 外源 MT 预处理对高温胁迫下甘蓝幼苗叶片丙二醛含量的影响

Fig. 4 Effects of melatonin pretreatment on MDA content in leaves of cabbage seedling under high temperature stress

2.5 外源褪黑素对高温胁迫条件下甘蓝幼苗叶片 SOD 活性的影响

由图 5 可知,高温胁迫条件下,随着胁迫时间增加,甘蓝幼苗叶片的 SOD 活性表现出先升高后降低的趋势,在 24 h 达到最大,以后随着高温胁迫处理时间的延长,SOD 活性下降。用 MT 预处理的甘蓝幼苗叶片的 SOD 活性比 CK 的显著升高,SOD 活性随着褪黑素浓度的增加也逐渐提

高,当褪黑素浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SOD 活性达到最大,以后随浓度增加逐渐降低,但是仍高于对照(CK)。3 个时期,25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 预处理的甘蓝幼苗叶片的 SOD 活性均与 CK 呈显著性差异,24 h 时,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 预处理的甘蓝幼苗叶片的 SOD 活性最高。说明 MT 预处理能够显著增加 SOD 活性,提高甘蓝幼苗抵抗高温胁迫的能力。

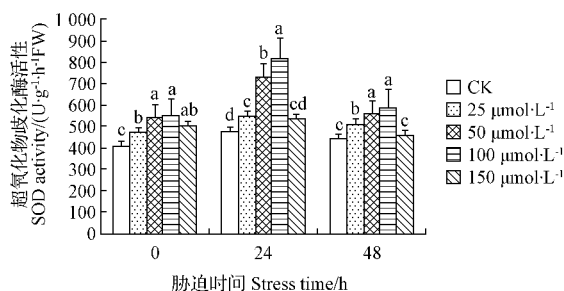


图 5 外源 MT 预处理对高温胁迫下甘蓝幼苗叶片 SOD 活性的影响

Fig. 5 Effects of melatonin pretreatment on activity of SOD in leaves of cabbage seedling under high temperature stress

3 讨论

徐向东等^[11]研究表明,褪黑素预处理能够明显缓解光反应中心的受害程度,提高幼苗叶片的叶绿素 a 含量,提高叶片的光合作用,减轻高温胁迫对植株光合器官的损害,提高植株抵抗高温的能力。高温胁迫条件下,导致叶绿素含量显著下降,一方面是由于高温胁迫降低了幼苗叶片叶绿素的合成速率,另一方面由于高温造成活性氧大量积累,加速了幼苗叶片叶绿素的降解。该研究结果表明,适宜浓度的褪黑素预处理可以增加甘蓝叶片叶绿素含量,维持高温条件下叶绿素含量,保证光合作用进行。差异不显著,有可能是高温胁迫时间较短所致。

细胞膜的热稳定性反映了植物耐热能力,高温胁迫下,细胞质膜、液泡膜和叶绿体膜等膜伤害和质膜透性的增加是导致高温伤害的主要原因^[12]。陈碧华等^[13-14]通过对耐热性不同的甘蓝

幼苗进行热激处理,测定其电解质渗透量,发现不耐热品种叶片中的膜透性增幅均大于耐热品种;陈以博等^[15]研究不结球白菜幼苗耐热性机制时也发现不耐热品种叶片电解质渗透率的增幅大于耐热品种;因此,相对电导率可以作为膜受损程度的重要指标。该试验中甘蓝幼苗叶片中相对电导率随高温胁迫时间延长逐渐增加,说明高温对细胞膜造成了破坏,经 MT 预处理的幼苗叶片中相对电导率有所减少,说明 MT 预处理能够减轻对膜结构的损害,保护膜完整性。

在高温条件下,植物启动热激蛋白质,可溶性蛋白质含量增加,植物耐热性与可溶性蛋白质合成速率的大小相关^[16]。该试验中,褪黑素预处理的甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量明显高于对照,说明褪黑素预处理能够提高甘蓝幼苗叶片可溶性蛋白质含量,增强抵抗高温的能力,也有可能与热激蛋白质相关。

陈少裕^[17]研究表明,膜脂氧化的最终产物丙二醛对生物膜造成严重伤害,另外膜质过氧化还会使膜蛋白质发生变异,形成聚合和交联,影响膜透性和流动性,从而对植物体产生伤害。高温胁迫条件下,植物体内丙二醛含量增加,对于一些不耐热性品种,丙二醛增加量也越大^[18]。该试验中,褪黑素预处理的甘蓝幼苗叶片丙二醛含量明显低于对照,说明褪黑素预处理能够减弱高温对细胞膜结构的破坏。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)均是植物酶促防御系统的重要保护酶^[19-20],高温胁迫引起的保护酶系统变化可以反映植物的耐热能力。吴国胜等^[21]通过对大白菜研究发现,热激后 POD 活性下降, CAT 活性提高, SOD 活性先上升后下降。有研究者发现,热胁迫下,甘蓝叶肉细胞的 SOD、POD 活性呈先下降后上升的趋势,这种变化与细胞膜热稳定性的变化相一致, SOD 活性与甘蓝品种的耐热性呈高度的正相关^[22-23]。陈碧华等^[24]通过热激处理对苗期甘蓝叶片保护酶活性和膜透性的影响研究,结果发现热激处理后,耐热甘蓝品种叶片 POD、

CAT、SOD 活性的增幅大于不耐热品种。在该试验中,喷施褪黑素后甘蓝幼苗叶片 SOD 活性明显高于对照,这说明喷施褪黑素能够增强 SOD 活性,以增强幼苗抵抗高温的能力。

综上所述,褪黑素能增加甘蓝幼苗在高温胁迫下叶绿素含量,保证光合作用进行;降低相对电导率和丙二醛含量,减少细胞渗透量,保护细胞膜完整性;增加可溶性蛋白质含量和增强保护酶(SOD)活性,抑制膜质过氧化,缓解高温胁迫对甘蓝幼苗的不良反应,增强抗逆性,其中以浓度 $50\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT 效果最佳。

参考文献

- [1] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. The physiological function of melatonin in plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2006(1):89-95.
- [2] DUBBELS R, REITER R J, KLENKE E, et al. Melatonin in edible plants identified by radio immunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Pineal Research*, 1995, 18(1):28-31.
- [3] JANAS K M, POSMYK M M. Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(12):3285-3292.
- [4] 王英利, 王英娟, 郝建国, 等. 外源褪黑素对绿豆在增强 UV-B 辐射下的防护作用[J]. *光子学报*, 2009, 38(10):2629-1633.
- [5] 徐向东, 孙艳, 孙波, 等. 高温胁迫下外源褪黑素对黄瓜幼苗活性氧代谢的影响[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(5):1295-1300.
- [6] 陈锦绣, 任云英, 董尧明. 采用田间和电导法鉴定几个结球甘蓝品种的耐热性试验[J]. *蔬菜*, 2002(8):30-31.
- [7] 方智远. 我国甘蓝产销变化与育种对策[J]. *中国蔬菜*, 2008(1):1-2.
- [8] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 2 版. 广州:华南理工大学出版社, 2006:64-66.
- [9] 刘宁, 高玉葆, 贾彩霞, 等. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性的变化[J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(1):11-14.
- [10] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006:217-225.
- [11] 徐向东, 孙艳, 郭晓琴, 等. 外源褪黑素对高温胁迫黄瓜幼苗光合作用和叶绿素荧光参数的影响[J]. *核农学报*, 2011, 25(1):179-184.
- [12] 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社, 1994.
- [13] 陈碧华, 罗庆熙, 王广印, 等. 热激处理对甘蓝幼苗叶片细胞

膜系统热稳定性的影响[J]. 华北农学报, 2007(5): 60-62.

[14] 陈碧华, 王广印, 林紫玉, 等. 热激处理对甘蓝幼苗耐热性的影响[J]. 广东农业科学, 2008(7): 39-41.

[15] 陈以博, 侯喜林, 陈晓峰. 不结球白菜幼苗耐热性机制初步研究[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(1): 27-31.

[16] HERREO M P, JOHSON R R. High temperature stress and pollen viability of maize[J]. Crop Science, 1980(20): 796-800.

[17] 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, 72(2): 84-90.

[18] 周人纲. 热激信号转导中的钙-钙调素途径[J]. 华北农学报, 2003, 18(院庆专辑): 24-29.

[19] 周人纲, 樊志和. 热锻炼对小麦叶片细胞膜及有关酶活性的

影响[J]. 作物学报, 1995, 21(5): 568-572.

[20] 叶陈亮, 柯玉琴, 陈伟. 大白菜耐热性的生理研究 III. 酶性和非酶性活性氧清除能力与耐热性[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(4): 498-501.

[21] 吴国胜, 曹婉红, 王永健. 细胞膜热稳定性及保护酶和大白菜耐热性关系[J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 3.

[22] 杜敏霞. 高温胁迫下几个甘蓝品种部分生理生化性状的变化[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.

[23] 向殉. 甘蓝早期抗热性鉴定及筛选方法的研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 1999.

[24] 陈碧华, 罗庆熙, 张百俊. 热激处理对甘蓝幼苗叶片保护酶活性和膜透性的影响[J]. 华北农学报, 2006, 21(5): 6-8.

Effect of Exogeneous Melatonin on Physiological Characteristic of Cabbage Seedlings Under High Temperature Stress

ZENG Qingdong, XU Zhongmin, ZHANG Enhui, GUO Jia, LI Shengjuan

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: In order to study the effect of exogenous melatonin on the physiological indexes of cabbage seedlings, the leaves of a cabbage variety ‘Qingan 58’ were sprayed with different concentration of melatonin. The results showed that pretreatment of exogenous MT could reduce the effect of high temperature on the chlorophyll content of cabbage seedlings. Pretreatment of exogenous MT could significantly reduce the relative conductivity and the malondialdehyde (MDA) content, increase the soluble protein content, and enhance the activity of super oxide dismutase (SOD) of cabbage leaves under high temperature stress. The results showed that pretreatment of MT decreased the influence of high temperature stress on the photosynthesis of cabbage seedling (chlorophyll), reduced electrolyte leakage, and protected the integrity of the lipid membrane. It reduced the membranous peroxide level of cabbage seedlings under high temperature stress, increased the activity of antioxidant enzymes, alleviated the harm caused by high temperature stress on seedling, and increased resistance of seedling to high temperature stress.

Keywords: melatonin; pretreatment; high temperature stress; cabbage seedlings; physiological characteristic