

DOI:10.11937/bfyy.201519002

# 高温胁迫对不同品种羽衣甘蓝幼苗叶的生理特性及 SOD、POD 同工酶的影响

李大红<sup>1</sup>, 赵丽<sup>2</sup>, 李贞<sup>3</sup>, 孙小茹<sup>3</sup>

(1. 黄淮学院 生物工程系, 河南 驻马店 463000; 2. 黄淮学院 园林绿化中心, 河南 驻马店 463000;

3. 驻马店市园林管理局, 河南 驻马店 463000)

**摘 要:**以 4 个不同品种的羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*)幼苗为试材,研究了在高温胁迫 8 d(39±0.5)℃/(28±0.5)℃(昼/夜)后,羽衣甘蓝幼苗叶片一些抗逆境的生理生化指标及 SOD、POD 同工酶变化,以探讨不同羽衣甘蓝植物对高温的适应性。结果表明:随胁迫时间的延长,不同品种的羽衣甘蓝的叶绿素含量显著下降,而幼苗叶 MDA、脯氨酸含量与质膜透性含量增加;在处理 2 d, SOD、POD 含量有较大幅度的升高,但第 4 天后开始出现下降,不同品种之间有显著差异;试验表明“名古屋”、“京冠红 2 号”比“红鸥”和“叶牡丹”有较强的耐热性;SOD、POD 同工酶研究表明,“名古屋”和“叶牡丹”的 SOD 同工酶谱带具有相似性,而与“红鸥”与“京冠红 2 号”不同;“名古屋”和“京冠红 2 号”的 POD 同工酶谱带相似,而“叶牡丹”与“红鸥”的 POD 谱带相似,但“名古屋”和“京冠红 2 号”与“叶牡丹”和“红鸥”的 POD 谱带差异较大。

**关键词:**羽衣甘蓝;高温胁迫;生理特征;同工酶

**中图分类号:**S 635.904<sup>+</sup>.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)19-0006-05

近年来,由于温室效应的加剧,全球平均气温的不断升高,高温已逐渐成为植物生产中主要胁迫因子之一。高温逆境可以引发一系列复杂的生理生化反应,其中叶绿素含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、丙二醛(MDA)以及细胞膜的透性是热胁迫响应的重要方面。这种变化不仅影响植物生理生化过程,还影响细胞膜的热稳定性(膜透性),最终影响植物的生长发育。植物对高温胁迫的响应差异显著依赖于植物的生理特性<sup>[1]</sup>,高温经常扰乱植物生长,对不同的植物的影响也不同,有研究报道<sup>[2]</sup>,通过比较叶片电导率,蜜柑可能比脐橙具有耐热性。因此对植物的生理特性研究,可以推测植物对高温的耐性。

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*)为十字花科芸苔属的 1 个变种,是一种原产于地中海和小亚细亚地区一二年生草本植物。栽培历史悠久,现在欧洲和美洲的国家多有种植。羽衣甘蓝有多种不同的品种,其叶形态多样,丰富多彩,叶色丰富,全株形如牡丹,也有食用羽衣甘蓝<sup>[3]</sup>。

羽衣甘蓝喜欢温冷天气,耐寒性很强,经低温锻炼幼苗有较强的抗低温能力,最低可达-12℃。最适生长温度为 20~25℃,种子发芽的适宜温度为 18~25℃。当温度超过 35℃时,植物生长和发育将受严重阻碍<sup>[4]</sup>。可见,羽衣甘蓝的生长发育对高温敏感。

羽衣甘蓝一般于 8 月底播种,而此时河南地区仍经常持续高温,所以热损伤是甘蓝生产中面临的一个重要问题。探讨高温胁迫下甘蓝叶的生理变化研究,对选择有抗耐高温羽衣甘蓝品种适合当地种植有重要意义。该研究通过模拟当地高温天气的温差变化,选择不同地区的品种,研究羽衣甘蓝在高温胁迫下其植株体内生理

**第一作者简介:**李大红(1968-),男,博士,副教授,现主要从事园林植物等研究工作。E-mail:moderatenlx@163.com

**基金项目:**河南省科技发展规划资助项目(112300410042)。

**收稿日期:**2015-06-26

**Abstract:** Flowering time of five generations of the combination from 459 and 86 were analyzed. The results showed that the  $h^2G$  of flowering time in spring rapeseed was 0.68. Flowering time in spring rapeseed was controlled by two pairs of additive gene. The accumulated temperature in test point also affected the day to flowering.

**Keywords:** *B. napus*; genetic analysis; flowering time; photoperiod

生化指标及 POD、SOD 同工酶的变化,来探讨不同品种羽衣甘蓝植物对高温的适应性,以及适应高温胁迫作用下的伤害机制,以期在选择苗期适应高温的合适羽衣甘蓝品种、增加羽衣甘蓝品种抗热害栽培、抗热害育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验选择“名古屋”、“红鸥”、“叶牡丹”和“京冠红 2 号”4 个羽衣甘蓝品种作为研究对象,市场购买种子,在黄淮学院光控培养箱内培育。在幼苗的生长期间,进行正常的水肥管理和病虫害防治。

### 1.2 试验方法

将羽衣甘蓝种子在适当的温度下催芽,种于穴苗盘中,待苗长至 10 cm 左右,把幼苗放置于人工气候箱( $23 \pm 0.5$  °C / ( $19 \pm 0.5$  °C (6:00—18:00 /  $18:00$ —6:00)) 预处理 5 d。5 d 后,将温度设置为 ( $39 \pm 0.5$  °C / ( $28 \pm 0.5$  °C (日/夜)),在试验过程中,相对湿度保持在 80%,光照强度 8 000 lx。

每次处理结束后,剪取植物的顶端最近成熟叶,洗净后用干净的纱布擦干。每次 3 株幼苗混合采样,重复 3 次。

### 1.3 项目测定

脯氨酸含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照高俊凤<sup>[5]</sup>的方法,以抑制 NBT 还原率达 50% 的酶量为 1 个酶单位(U)。过氧化物酶(POD)活性测定参照陈建勋等<sup>[6]</sup>的方法。POD 活性以每分钟 OD<sub>470</sub> 增加 0.01 的酶量为 1 个酶活力单位(U)。细胞膜相对透性的测定采用电导仪法,参照邹琦<sup>[7]</sup>的方法。叶绿素含量测定参照李合生<sup>[8]</sup>的丙酮乙醇混合法。丙二醛(MDA)含量测定参照张志良等<sup>[9]</sup>的硫代巴比妥酸法。超氧化物歧化酶、过氧化物酶同工酶测定采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[10]</sup>。

### 1.4 数据分析

利用 Excel 软件用于数据处理,统计分析使用 SPSS 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同高温胁迫下羽衣甘蓝叶片叶绿素含量的变化

植物的叶绿素含量直接影响植物的光合作用,高温下植物叶片叶绿素含量的测定能反映植物的耐热性。由图 1 可以看出,在处理过程中各羽衣甘蓝品种的叶绿素含量随时间延长逐渐下降,各处理之间有显著差异( $P < 0.05$ )。在各品种之间,叶绿素含量在高温处理 2 d “叶牡丹”高于“红鸥”、“名古屋”和“京冠红 2 号”,在处理

第 4~8 天,“名古屋”叶绿素含量高于“京冠红 2 号”、“红鸥”和“叶牡丹”,之间有显著差异。

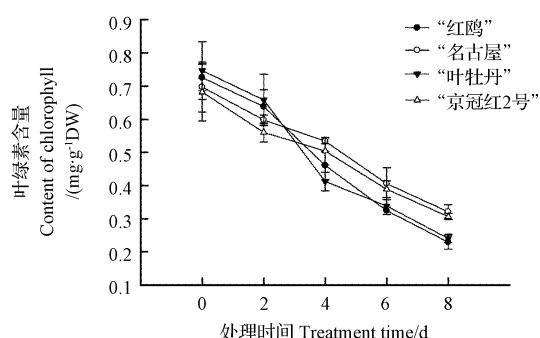


图 1 不同高温胁迫对羽衣甘蓝叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of different high temperature treatments on chlorophyll content in *Brassica oleracea* young leaves

### 2.2 不同高温胁迫下羽衣甘蓝幼苗脯氨酸含量的变化

脯氨酸为植物中一种小分子渗透调节物质,当植物受到高温胁迫时,脯氨酸的积累能提高植物的耐热性。其不但可作为渗透调节物质,也可作为氮源的蛋白质及细胞结构保护剂。脯氨酸的积累量可作为植物耐热性的生理指标。从图 2 可以看到,在高温胁迫下,随着处理时间的增加,各羽衣甘蓝品种叶中脯氨酸含量均提高。在相同的处理时间里,“红鸥”脯氨酸含量低于“叶牡丹”、“名古屋”和“京冠红 2 号”。随着处理时间的增加,脯氨酸的含量呈上升趋势,但在处理第 8 天时,各品种的脯氨酸含量下降,且品种之间有显著差异。第 8 天的脯氨酸含量略有下降,这可能是因为植株在连续高温下,损伤比较严重,自我调节能力下降。

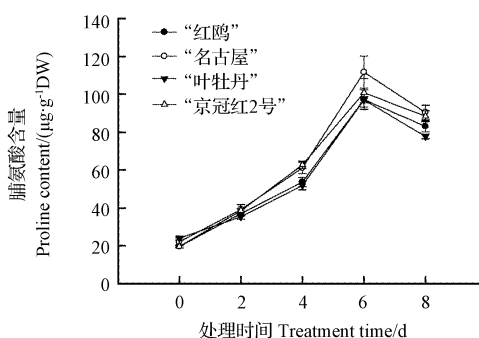


图 2 不同高温胁迫对羽衣甘蓝渗透调节物质含量的影响

Fig. 2 Effect of different high temperature treatments on osmotic adjustment substances content in *Brassica oleracea*

### 2.3 不同高温胁迫下羽衣甘蓝幼苗抗氧化物质含量的变化

超氧化物歧化酶(SOD)是重要的活性氧清除酶,当外部胁迫导致的活性氧物质大量产生时,能有效地清除

自由基,保护细胞对抗氧化应激损伤。从图 3 可以看出,随着高温胁迫时间的增加,4 个品种 SOD 活性变化趋势都是随处理时间增加而升高。但在处理 0 d 时,各品种之间没有显著差异,在高温处理 2 d 时,SOD 活性“红鸥”低于“叶牡丹”、“名古屋”和“京冠红 2 号”之间有

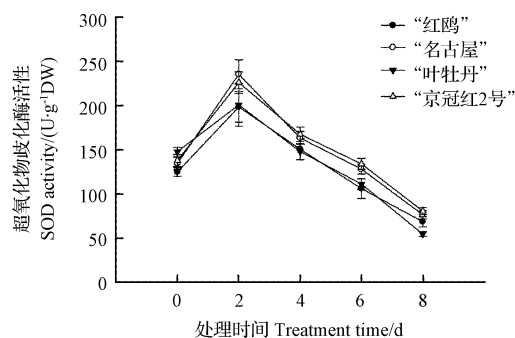


图 3 不同高温胁迫对羽衣甘蓝 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of different high temperature treatments on

SOD activity in *Brassica oleracea*

极显著差异。说明在高温胁迫下,羽衣甘蓝可以应激提高体内 SOD 活性以清除高温胁迫导致的活性氧自由基对细胞造成的危害,且“名古屋”、“京冠红 2 号”、“红鸥”和“叶牡丹”SOD 活性达到差异显著水平。但当胁迫时间增加时,产生的活性氧增加,SOD 活性并没有增加反而减少,但“名古屋”和“京冠红 2 号”的品种酶活性比“红鸥”和“叶牡丹”降低的少。

由图 4 可以看出,各品种羽衣甘蓝的过氧化物酶(POD)活性变化与 SOD 活性类似。“名古屋”、“京冠红 2 号”、“红鸥”和“叶牡丹”POD 活性达到差异显著水平。但当胁迫时间增加时,产生的活性氧的增加,POD 活性减少,但“红鸥”和“叶牡丹”比“名古屋”和“京冠红 2 号”品种的酶活性下降得更多。

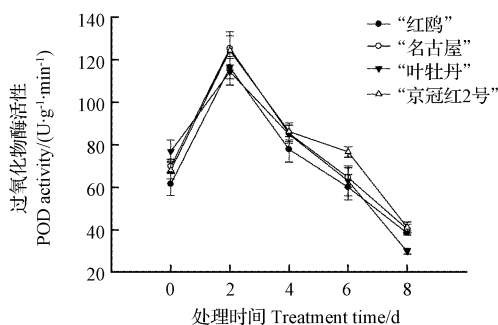


图 4 不同高温胁迫对羽衣甘蓝 POD 活性的影响

Fig. 4 Effect of different high temperature treatments on

POD activity in *Brassica oleracea*

## 2.4 不同高温胁迫下羽衣甘蓝幼苗叶膜脂过氧化物质与质膜透性的变化

高温胁迫诱导的 ROS 的产生对植物有伤害作用。MDA 是脂质过氧化的主要产物,其量的变化可以作为对氧化损伤指标引起的植物应力反应。试验检测了 4 个品种羽衣甘蓝叶片中丙二醛的含量。由图 5 可以看出,随着处理时间的增加,MDA 含量呈增加趋势。第 0 天处理后,各品种之间叶片 MDA 含量变化没有达到差异显著水平,但随着处理时间的增加,各品种之间差异显著,“红鸥”高于“叶牡丹”、“名古屋”、“京冠红 2 号”的脯氨酸含量,说明在长时间高温胁迫下,植物细胞的质膜被严重的损坏,而“名古屋”和“京冠红 2 号”影响较小,表现了较强的耐热性。随着处理时间的增加,MDA 也呈增加趋势,但“红鸥”和“叶牡丹”升高速度较快,说明其产生的氧化物质比较多,质膜损坏较严重。

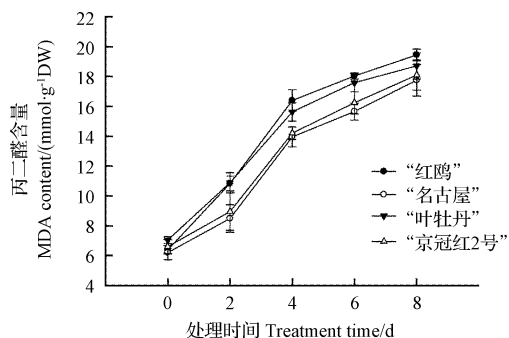


图 5 不同高温胁迫对羽衣甘蓝幼叶 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effect of different high temperature treatments on

MDA content in *Brassica oleracea* young leaves

细胞膜是细胞与环境之间的接口,各种胁迫在细胞影响的第一个效应质膜上,胁迫对膜的结构和功能的影响通常是选择性下降,甚至电解质和一些小分子有机物的丢失。由图 6 可以看出,在高温胁迫下不同品种甘蓝幼苗细胞膜透性和 MDA 含量变化趋势相似。

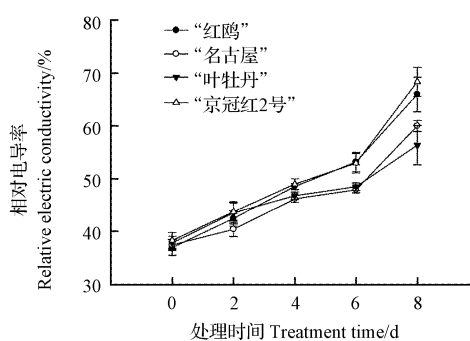
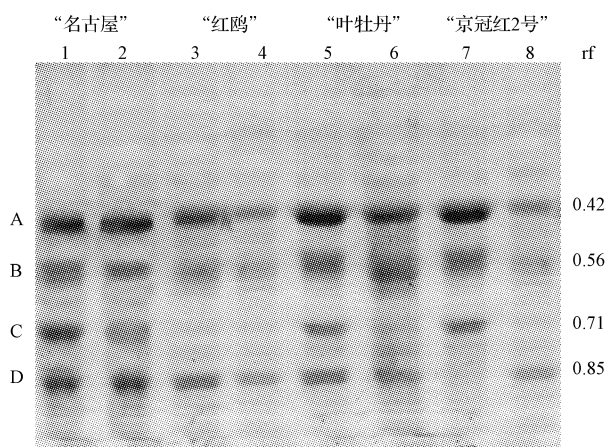


图 6 不同高温胁迫对羽衣甘蓝幼叶电导率的影响

Fig. 6 Effect of different high temperature treatments on relative electric conductivity in *Brassica oleracea* young leaves

## 2.5 SOD、POD 同工酶分析

由图 7 可知,在高温处理 2 d 时,羽衣甘蓝叶片出现 4 条 SOD 同工酶带(A( $r_f=0.45$ )、B( $r_f=0.56$ )、C( $r_f=0.71$ )、D( $r_f=0.85$ )),不同品种酶带数为 3~4 条。高温处理后 6 d,“名古屋”酶带没有变化,但 C 带亮度减弱;“红鸥”是 3 条酶带,但处理 6 d 时,A、B 2 条酶带减弱;“叶牡丹”和“京冠红 2 号”都出现了酶带的变化,“叶牡丹”减少 1 条酶带 C,而“京冠红 2 号”的 C 酶带变成第 6 天的 D 带。说明在高温胁迫下,羽衣甘蓝 SOD 同工酶的酶带表达的量会发生变化。这种不同胁迫时间的酶带数量差异是受到高温胁迫影响的结果,反映了植物在响应胁迫的生理代谢变化的差异;酶带的深浅反映出酶表达量及活性,在初期胁迫的时候,叶中酶的表达量及活性高于胁迫后期,这与酶活性的测定结果与分析保持一致。



注:1,3,5,7 为处理 2 d 的样品;2,4,6,8 为处理 6 d 的样品。图 8 同。

Note:1,3,5 and 7 sample treated after 2 days;2,4,6 and 8 sample treated after 6 days. The same as Fig. 8.

图 7 羽衣甘蓝叶内 SOD 同工酶谱带

Fig. 7 Superoxide dismutase isoenzyme pattern of *Brassica oleracea* in PAGE

不同时间 4 个品种羽衣甘蓝 POD 同工酶电泳图谱如图 8 所示,4 个品种共有的 3 个同工酶带(A( $r_f=0.49$ )、B( $r_f=0.71$ )、C( $r_f=0.79$ )),但在各个品种之间的酶带不同,处理 2 d 时,POD 酶谱组成与第 6 天时变化都不大,且各条带强度减弱与 POD 活性变化趋势基本一致。

## 3 结论与讨论

高温抑制植物的生长和发育<sup>[11]</sup>。在该研究中,羽衣甘蓝生长被高温抑制,这与前人的研究是一致的。羽衣甘蓝是一种原产于欧洲的植物,其生长的最佳温度范围是 15~25℃。试验中的温度影响羽衣甘蓝的生长。如图 1 所示,叶绿素含量随着高温时间的延长,叶绿素含

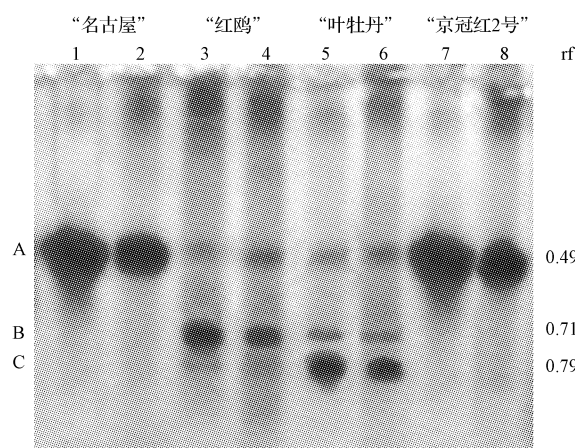


图 8 羽衣甘蓝叶内 POD 同工酶谱带

Fig. 8 Peroxidase isoenzyme pattern of *Brassica oleracea* in PAGE

量出现下降趋势,含量多少为“名古屋”>“京冠红 2 号”>“叶牡丹”>“红鸥”。

MDA 是脂质过氧化的产物,往往被视为胁迫损伤的指标之一<sup>[12-13]</sup>。在该研究中,从热胁迫下羽衣甘蓝叶片的 MDA 含量来看,得到相同的结果。如图 5 显示,“京冠红 2 号”和“名古屋”的自由基的产生较少,而“叶牡丹”和“红鸥”的丙二醛均值表现较其它略高,而且随着时间的增长都有增加的趋势。说明高温处理加剧了氧自由基的积累;但“京冠红 2 号”和“名古屋”有较强的保护作用。另外,“京冠红 2 号”和“名古屋”还表现为相对电导率低于“叶牡丹”和“红鸥”的特点。超氧化物歧化酶(SOD)在许多细胞器里催化  $O_2^-$  转换  $H_2O_2$ <sup>[14]</sup>,主要的抗氧化酶包括 SOD、POD,是重要的调节细胞内  $H_2O_2$  之一<sup>[15]</sup>,从而防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞质膜的伤害,许多植物抗逆研究已经表明,SOD 活性与植物抗逆性(抗寒、抗旱、抗高温等)及耐受性(耐高温、耐脱水等)有极为密切的关系<sup>[16-17]</sup>。该研究结果表明,在高温胁迫下,“名古屋”、“京冠红 2 号”、“叶牡丹”、“红鸥”的 SOD、POD 活性在处理初期升高,在处理后期比最高时期有一定的下降,但没有进行高温处理时高,说明羽衣甘蓝在高温下,SOD、POD 活性提高,而且“京冠红 2 号”>“名古屋”>“叶牡丹”>“红鸥”。

植物同工酶分析可以很好地了解植物的生理活动。SOD、POD 广泛存在于高等植物组织,参与各种生理活动,有不同的分子形式及组织特异性。在不同生长期的植物同工酶成分和酶的活性是不同的,表现出多态性。该研究表明,不同品种羽衣甘蓝的 SOD、POD 的谱带有差异,表现为品种的特异性。“名古屋”和“叶牡丹”的 SOD 同工酶谱带具有相似性,而与“红鸥”和“京冠红 2

号”不同。“名古屋”和“京冠红 2 号”的 POD 同工酶谱带相似;而“叶牡丹”与“红鸥”的 POD 谱带相似,但“名古屋”和“京冠红 2 号”与“叶牡丹”和“红鸥”的 POD 谱带差异较大。这与 SOD、POD 活性一致。

研究表明,当胁迫发生时,高耐性的品种由于平衡系统的数量多,细胞存在较强抗逆酶活性,所以平衡能力、缓冲应激能力强,能迅速调整系统,从平衡到另一种平衡,从而应对波动的影响。该试验结果表明,“京冠红 2 号”和“名古屋”在高温逆境中可能有较强的平衡系统,对逆境有较强的忍受能力,而“叶牡丹”和“红鸥”平衡系统可能较弱,对逆境忍受能力不强。所有这些结果表明,“京冠红 2 号”和“名古屋”可能有较强的抗高温能力。

### 参考文献

- [1] ZAVORUEVA E N, USHAKOVA S A. Characteristics of slow induction curve of chlorophyll fluorescence and CO<sub>2</sub> exchange for the assessment of plant heat tolerance at various levels of light intensity[J]. Russ J Plant Physiol, 2004, 51: 294-301.
- [2] 孙中海, 马湘涛. 柑橘叶片细胞膜热稳定性的研究[J]. 华中农业大学学报, 1999(18): 375-377.
- [3] 赵华渊, 李莹莹. 羽衣甘蓝的观赏特性及园林应用[J]. 黑龙江农业科学, 2011(2): 96-97.
- [4] 贾兰虹, 张华艳, 李长海. 羽衣甘蓝苗期低温控制反季节栽培技术[J]. 北方园艺, 2005(2): 46-47.
- [5] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [6] 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, 2006.
- [7] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [8] 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.
- [9] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [10] 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯, 1983, 19(6): 44-45.
- [11] WAHID A, GELANI S, ASHRAF M, et al. Foolad Heat tolerance in plants: an overview Environ[J]. Exp Bot, 2007, 61: 199-223.
- [12] HSU Y T, KAO C H. Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines[J]. Plant Soil, 2007, 291: 27-37.
- [13] MISHRA Y, BHARGAVA P, RAI L C. Differential induction of enzymes and antioxidants of the antioxidative defense system in *Anabaena doliolum* exposed to heat stress[J]. J Therm Biol, 2005, 30: 524-531.
- [14] VYAS D, KUMAR S. Purification and partial characterization of a low temperature responsive Mn-SOD from tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329: 831-838.
- [15] NOCTOR G, FOYER C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. Annu Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol, 1998, 49(4): 246-279.
- [16] 王爱国, 罗广华, 邵从本. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983, 9(1): 77-79.
- [17] 武宝珂, 格林, 托德. 小麦幼苗中过氧化物歧化酶活性与幼苗脱水忍耐性相关性的研究[J]. 植物学报, 1985, 27(2): 152-160.

## Effect of High Temperature Stress on Physiological Characteristics and POD, SOD Isoenzyme in *Brassica oleracea* Seedlings

LI Dahong<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>2</sup>, LI Zhen<sup>3</sup>, SUN Xiaoru<sup>3</sup>

(1. Department of Bioengineering, Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000; 2. Garden Center of Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000; 3. Garden of Zhumadian Bureau, Zhumadian, Henan 463000)

**Abstract:** Four different regions of the kales (*Brassica oleracea*) seedlings were used as materials, treated at (39±0.5)°C / (28±0.5)°C (day/night temperature) for 8 days, and several related physiological indexes and SOD, POD isoenzyme in kale seedlings were determined, in order to discuss their plant adaptability under high temperature conditions. The results showed that the relative electric conductivity content, contents of malondialdehyde (MDA), and free proline were gradually increased, but chlorophyll content decreased with the time of high temperature continued in different varieties. During the early 2 day after treatment, superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities increased dramatically, while fourth days later, they began to decline. But there were significant differences among different varieties. Research data showed that ‘Nagoya’ and ‘Jingguan red 2’ had stronger heat resistance than the ‘Red gull’ and ‘Leaf peony’. According to the analysis of POD, SOD isoenzyme bands, the band of SOD isoenzyme in ‘Nagoya’ and ‘Leaf peony’ were similar, and ‘Red gull’ and ‘Jingguan red 2’ were different. The bands of POD isoenzyme were similar between ‘Nagoya’ and ‘Jingguan red 2’, while ‘Leaf peony’ and ‘Red gull’ POD bands were similar, the bands of POD isoenzyme were difference between ‘Nagoya’, ‘Jingguan red 2’ and ‘Leaf peony’, ‘Red gull’.

**Keywords:** *Brassica oleracea*; high temperature stress; physiological characteristics; isoenzyme