叶朝军,万　林,孙　继,等. 过氧化氢浸种处理对油菜幼苗抗寒生理特性的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):104 – 106,156.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2017.20.023

过氧化氢浸种处理对油菜幼苗抗寒生理特性的影响

叶朝军[1], 万　林[2], 孙　继[1,3], 金渊博[1], 王怡娟[1], 江海东[2]
(1. 温州市农业科学研究院,浙江温州 325006; 2. 南京农业大学,江苏南京 210095; 3. 浙南作物育种重点实验室,浙江温州 325006)

摘要:以南农油 4 号(*Brassica napus* cv. Nannongyou 4)油菜品种为试验材料,研究 0.05% 浓度过氧化氢(H_2O_2)浸种处理对低温下油菜幼苗活性氧、抗氧化酶系统和非酶抗氧化剂的影响。结果表明,0.05% 浓度过氧化氢浸种能够有效降低丙二醛(MDA)含量,在胁迫后期(大于 3 d),H_2O_2 处理下的油菜叶片 H_2O_2 含量和 O_2^-·产生速率均显著低于对照。抗氧化酶活性的数据表明,H_2O_2 浸种处理能有效提高逆境胁迫下油菜叶片中的抗氧化酶活性,以处理 6 d 为例,油菜叶片的 SOD、POD、CAT 活性分别提高了 29.8%、21.0%、50.3%;另外,H_2O_2 浸种处理后油菜的 AsA、GSH 含量,AsA/DHA 和 GSH/GSSG 也有显著增加。由此可见,过氧化氢浸种处理可缓解低温对油菜的伤害。

关键词:油菜;过氧化氢;浸种;低温胁迫;抗氧化系统
中图分类号: S634.301　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2017)20 – 0104 – 03

油菜是我国长江中下游地区主要的油料作物,其种植面积和总产均居世界首位[1]。近年来,直播油菜以其省工节本的优点受到广大农民的欢迎。但由于耕作制度的改变或茬口的原因等,往往播种较晚,出苗后容易遭受低温冻害,引起代谢紊乱而影响油菜生长[2]。因此研究和防治冷害对油菜的影响意义重大。

植物在正常生长情况下,体内活性氧(ROS)的产生与清除处于一种动态平衡。而在低温胁迫条件下植物体内膜脂过氧化进程加快,ROS 的代谢紊乱,积累的 ROS 会对植物造成毒害作用[3-4]。植物体内清除 ROS 的系统有抗氧化酶类及非酶抗氧化剂等物质,这些物质协同作用能有效清除 ROS,保护膜的完整性,提高植物抗寒性。植物体内的抗氧化系统由小分子抗氧化物和抗氧化酶组成[5]。侯丽霞研究发现用适宜浓度双氧水(H_2O_2)喷施油菜叶片提高了油菜的抗寒性[6]。浸种是生产上一种常用的药剂处理方式,周筱玲研究表明,H_2O_2 浸种能显著提高油菜种子发芽率[7]。万林等研究表明,H_2O_2 浸种能有效缓解低温胁迫对苗期油菜生长的抑制效应[8]。

总体来看,目前 H_2O_2 浸种对油菜抗寒生理研究较为薄弱。万林等试验在大田进行,温度波动较大[8]。因此,本试验以抗寒性品种南农油 4 号为试验材料,研究其经过 H_2O_2 浸种处理后,苗期油菜在低温胁迫下叶片中 ROS 含量、抗氧化酶活性及抗氧化物质含量的变化,以期为油菜的抗寒栽培提供理论依据和技术支持。

1　材料与方法

1.1　试验材料与设计

供试油菜品种为南农油 4 号(*Brassica napus* cv. Nannongyou 4)。2013 年 10 月 28 日,以筛选出的质量浓度为 0.05% 的 H_2O_2 于黑暗下浸泡油菜种子 8 h,以去离子水浸种作为对照。浸种完成后用去离子水漂洗 3 次后晾干,播于规格为 7 cm×7 cm×5 cm 的小花盆中,培养基质为沙土(1∶1 混合)。置于(20.0±1.0) ℃/(15.0±1.0) ℃光照培养箱中培养,油菜苗长出真叶时定苗,待油菜长出 3 张真叶开始进行低温胁迫。设置光照培养箱内温度为 4.0±1.0 ℃,连续胁迫 9 d,每个处理重复 3 次。测量时,从 3 个重复处理中选取生长一致的 5 株幼苗,每株幼苗均以自上而下第 3 张真叶作为测量对象。

1.2　测定方法

H_2O_2 含量测定参照 Moloi 等的方法[9];丙二醛(MDA)含量测定参照 Hodges 等的方法[10];超氧阴离子自由基(O_2^-·)产生速率测定参照 Elstner 等的方法[11]并有所改动。取 0.5 mL 的粗酶液、0.5 mL 的 65 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 7.8)、1 mL 的 10 mmol/L 磺胺和 1 mL 的 7 mmol/L 的 α – 萘胺,摇匀后 25 ℃ 水浴 20 min。在 530 nm 条件下测定其吸光度。超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化物酶(POD)活性测定参照 Tan 等的方法[12];过氧化氢酶(CAT)活性测定主要是参照 Chance 等的方法[13]并有所修改。0.1 mL 酶液加 3 mL CAT 反应液(0.075% H_2O_2 溶液 1 mL,0.05 mol/L pH 值 7.0 的磷酸缓冲液 1.9 mL),240 nm 下比色,每隔 30 s 读取吸光度的下降值。抗坏血酸(AsA)及脱氢抗坏血酸(DHA)含量参照 Khanna – Chopra 等的方法[14]提取测定;谷胱甘肽还原型(GSH)和氧化型(GSSG)含量参照 Paradiso 等的方法[15]测定。以上测量均在南京农业大学植物生理实验室测量完成。

收稿日期:2017 – 03 – 24
基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD20B05 – 03);中央高校基本科研业务费(编号:KYZ201202 – 7);江苏省气象科研开放基金(编号:KZ201104);浙江省温州市重点科技创新团队项目(编号:C20150008)。
作者简介:叶朝军(1981—),男,浙江洞头人,硕士,助理研究员,主要从事作物逆境生理研究。Tel:(0577)88429616;E – mail:24283680@qq.com。
通信作者:江海东,博士,副教授,主要从事作物生理生态研究。Tel:(025)84395713;E – mail:hdjiang@njau.edu.cn。

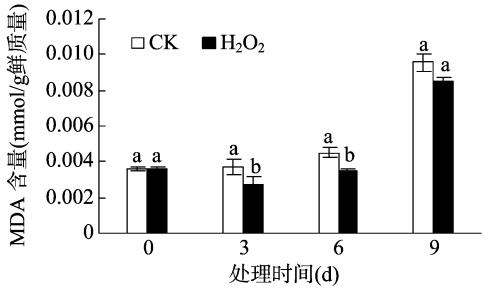
1.3　数据分析与作图

每个测量数据均 5 次重复,取其平均值。采用 Excel 2010 作图,运用 SPSS 19.0 进行差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　油菜叶片 MDA 含量的比较

从图 1 可以看出,随着胁迫时间延长,对照油菜 MDA 含量呈上升趋势,而 H_2O_2 处理油菜 MDA 含量呈先降后升的趋势。在胁迫期间,H_2O_2 处理油菜 MDA 含量均低于对照。在胁迫 3、6、9 d,H_2O_2 处理下 MDA 含量比对照分别减少了 26.9%、23.7%、11.4%。



图中不同小写字母表示处理和对照之间有显著差异($P<0.05$)。下图同

图1　H_2O_2 浸种对低温胁迫下油菜苗期叶片 MDA 含量的影响

2.2　油菜叶片 H_2O_2 含量和 O_2^-·产生速率的比较

O_2^-·和 H_2O_2 是植物体内 2 类重要的活性氧。图 2 显示,对照和 H_2O_2 处理油菜叶片中的 O_2^-·产生速率和 H_2O_2 含量均随胁迫时间的延长而明显上升。在胁迫初期(3 d 时),H_2O_2 处理下的油菜叶片 H_2O_2 含量高于对照处理,这可能是由于 H_2O_2 浸种处理使油菜提前进入氧化胁迫阶段,而在胁迫后期(9 d 时),H_2O_2 处理下的油菜叶片 H_2O_2 含量和 O_2^-·产生速率均显著低于对照。

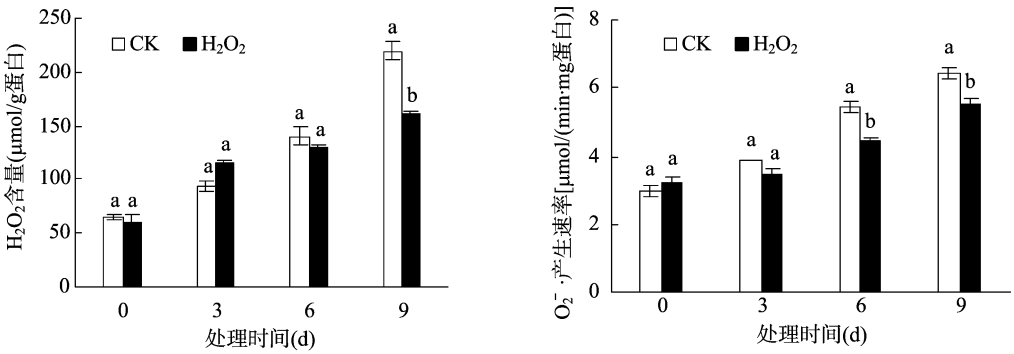


图2　H_2O_2 浸种对低温胁迫下油菜苗期叶片 H_2O_2 含量及 O_2^-· 产生速率的影响

2.3　油菜幼苗 SOD、POD、CAT 活性比较

SOD、POD 和 CAT 是植物体内重要的 3 类抗氧化酶。由图 3 可以看出,H_2O_2 浸种处理可提高低温胁迫下这 3 类酶的活性。与对照相比,在低温胁迫 6 d,油菜叶片的 SOD、POD、CAT 活性分别提高了 29.8%、21.0%、50.3%,说明 H_2O_2 浸种处理能有效提高逆境胁迫下油菜叶片中的抗氧化酶活性,从而提高其抗寒性,缓解低温对油菜的伤害。

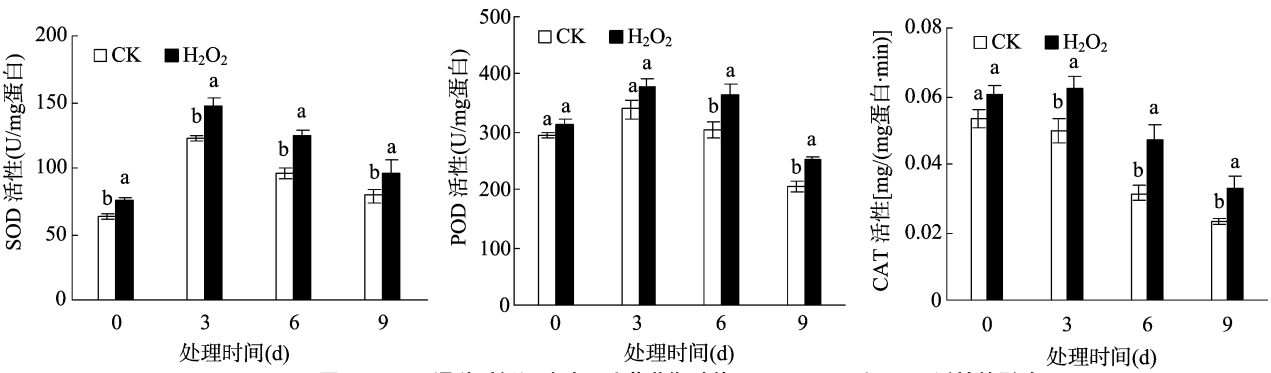


图3　H_2O_2 浸种对低温胁迫下油菜苗期叶片 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

2.4　油菜叶片 AsA 和 GSH 的比较

AsA 和 GSH 是植物体内重要的抗氧化剂,通过 AsA-GSH 循环发挥作用。由图 4 可以看出,在低温胁迫期间,AsA 含量呈上升趋势,GSH 含量呈先升后降的趋势。整体而言,H_2O_2 浸种处理的油菜 AsA、GSH 含量高于对照油菜。在低温胁迫 6 d,H_2O_2 浸种处理的油菜 AsA、GSH 含量分别比对照高出 16.4%、28.7%。

另外,植物体内除氧化态的 AsA、GSH 外,还存在着还原态的 DHA 和 GSSG。AsA/DHA 和 GSH/GSSG 更能体现植物整体的氧化还原状况。从图 4 可以看出,AsA/DHA、GSH/GSSG 的比值均随胁迫时间的延长先上升后趋于稳定。整体而言,H_2O_2 浸种处理的油菜 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 均高于对照油菜。在低温胁迫 9 d,H_2O_2 浸种处理的油菜 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 分别比对照高出 15.6%、15.8%。

3　讨论

研究发现,在胁迫初期,H_2O_2 浸种处理的油菜叶片 MDA 含量和 O_2^-·产生速率均下降,而随着胁迫程度的加重,叶片

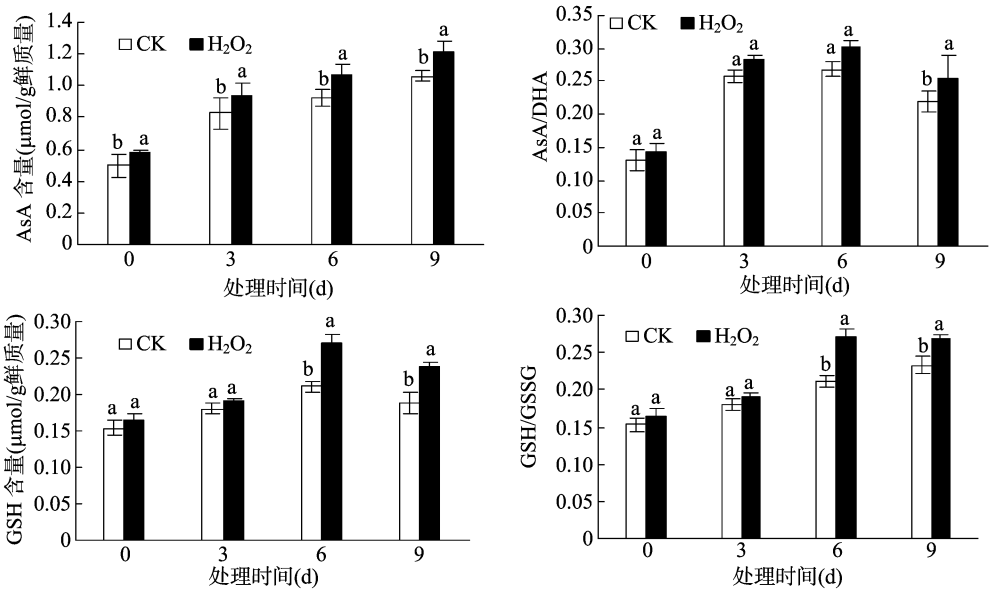


图4　H_2O_2浸种对低温胁迫下油菜苗期叶片 AsA 含量、GSH 含量、AsA/DHA、GSH/GSSG 的影响

的 MDA 含量及 ROS 水平迅速增加[6]。其变化趋势说明植物叶片对低温胁迫有一个适应过程,胁迫程度加重时,植物体内清除 ROS 的能力下降,植物受到氧化伤害。同时也说明 H_2O_2 浸种能在一定程度上有效缓解低温胁迫下油菜叶片 ROS 的大量积累,减少膜伤害。徐田军等的研究结果[16]也证实了该结论。本试验结果表明,在胁迫 3、6、9 d,H_2O_2 处理下 MDA 的含量比对照分别减少了 26.9%、23.7%、11.4%。另外,在胁迫后期(9 d 时),H_2O_2 处理下的油菜叶片 H_2O_2 含量和O_2^-·产生速率均显著低于对照。说明前期 H_2O_2 浸种处理可对低温胁迫下的幼苗后期生长起到一定的保护作用。

植物受到低温胁迫后,其体内的抗氧化酶系统就会得到加强[17],这是保护植物不受氧化胁迫的抗逆性机制之一[18]。SOD、POD 和 CAT 作为植物细胞主要的保护酶,协调作用共同清除植物体内活性氧。万林等研究发现,H_2O_2 浸种处理极大地促进了低温下油菜叶片中的 POD、CAT 活性的提高,使得植物体内多余的活性氧被迅速清除,降低了 MDA 含量,以减少膜伤害[8];吕军芬等发现 H_2O_2 浸种处理能显著提高低温胁迫下西瓜(*Citrullus lanatus*)叶片的 SOD 活性[19]。本试验结果表明,低温胁迫下油菜叶片的 SOD、POD 活性呈先升后下降的趋势,而 CAT 的活性呈一直下降的趋势。这可能是由于 CAT 对低温胁迫的反应与 POD、SOD 略有不同,CAT 对低温胁迫比较敏感。与对照相比,H_2O_2 浸种处理显著提高了油菜幼苗叶片中 SOD、POD、CAT 活性。结合 MDA、H_2O_2 含量,以及O_2^-·产生速率可以推断,前期(小于 3 d)的低温胁迫是一个抗寒锻炼的过程。随着胁迫程度的增强,细胞膜抗氧化系统遭到破坏。

AsA 和 GSH 是植物体内重要的非酶抗氧化剂。在防止细胞膜过氧化、保持细胞膜系统的完整性、延缓细胞的衰老和增强植物抗逆性方面发挥着重要功能[20]。本试验结果表明,在胁迫初期,AsA 含量随着幼苗的生长而上升,而 GSH 含量则先升高后下降。H_2O_2 处理的 ASA 含量均一直显著高于对照;处理后期(≥6 d 时),H_2O_2 处理的 GSH 含量也显著高于对照。这说明 H_2O_2 浸种能提高 ASA、GSH 含量,以减轻油菜的膜脂过氧化,增强其耐寒性。这与小麦(*Triticum aestivum*)[21]、草莓(*Fragaria* × *ananassa*)[22]等的研究相一致。

综上所述,低温胁迫下,H_2O_2 浸种处理能够通过降低 MDA 含量、ROS 水平以及提高抗氧化酶(SOD、POD、CAT)活性、增加非酶抗氧化剂(AsA、GSH)含量来提高油菜抗寒性,缓解低温胁迫伤害。尽管本研究没有涉及外源 H_2O_2 处理对油菜后期生长和产量的影响,但外源 H_2O_2 处理有助于低温胁迫下油菜苗期的生长发育,必然可以增加油菜生物量的积累,从而减少低温造成的产量损失。

参考文献:

[1]张冬晓. 我国油菜生产的发展与展望[J]. 中国油料作物学报,2001,23(4):79-81.

[2]周　琴,孙小芳,郭月玲,等. 6-BA 和 PP_{333} 对油菜幼苗抗寒性的影响[J]. 中国油料作物学报,2007,29(3):286-290.

[3]朱惠霞,孙万仓,邓　斌,等. 白菜型冬油菜品种的抗寒性及其生理生化特性[J]. 西北农业学报,2007,16(4):34-38.

[4]蒲媛媛,孙万仓. 白菜型冬油菜抗寒性与生理生化特性关系[J]. 分子植物育种,2010,8(2):335-339.

[5]陈　超. 低温条件下冬小麦糖代谢和抗氧化活性与耐寒性关系[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.

[6]侯丽霞. H_2O_2 对低温下油菜幼苗几个生理指标的影响[J]. 湖北农业科学,2013,52(21):5144-5146.

[7]周筱玲. H_2O_2 浸种对油菜种子萌发的影响[J]. 九江师专学报(社会科学版),1997,15(6):32-35.

[8]万　林,张　曼,钟飞燕,等. H_2O_2 浸种对晚播油菜苗期耐寒性的影响[J]. 中国油料作物学报,2015,37(6):811-819.

[9]Moloi M J,van der Westhuizen A J. The reactive Oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid [J]. Journal of Plant Physiology,2006,163(11):1118-1125.

[10]Hodges D M, Delong J M, Forney C F, et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. Planta,1999,207(4):604-611.

(下转第 156 页)

表 1　不同嫩砧嫁接时间对猕猴桃嫁接成活和保存的影响

嫁接日期（月－日）	萌芽日期（月－日）	萌发时间（d）	嫁接数量（株）	成活数（株）	保存数（株）	成活率（%）	保存率（%）
05－15	05－24	9	150	135	125	90.00	92.59
06－14	06－23	9	136	133	133	97.79	100.00
07－17	07－26	9	145	130	115	89.66	88.46
08－15	08－25	10	123	100	91	81.30	91.00
09－12	09－24	12	245	233	225	95.10	96.57
10－15	10－28	13	123	109	98	88.62	89.91

注：萌发时间＝萌芽数达到嫁接数 50% 的日期－嫁接日期。

14 日嫁接的猕猴桃苗成活 4 个月时的茎粗相对最大，为 0.86 cm，其次是 5 月 15 日、7 月 17 日嫁接的猕猴桃苗，其茎粗可达到 0.80 cm；8 月 15 日、9 月 12 日嫁接的猕猴桃苗其茎粗分别为 0.78、0.75 cm；10 月 15 日嫁接的猕猴桃苗其茎粗相对最小，仅为 0.74 cm；从嫁接苗茎粗整个生长动态来看，6 月 14 日嫁接的猕猴桃苗生长相对较旺，而 9 月 12 日、10 月 15 日这 2 个时间嫁接的猕猴桃苗，由于生长不久就临近冬季，猕猴桃苗很快落叶进入休眠期而停止生长。

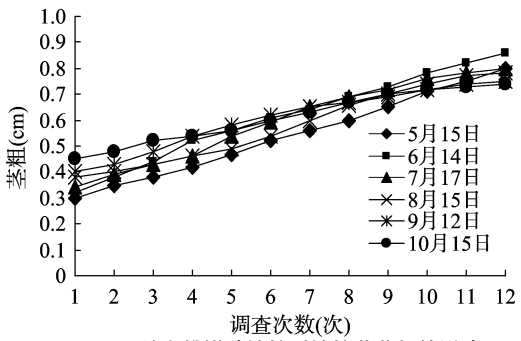


图1　猕猴桃嫩砧嫁接对嫁接苗茎粗的影响

3　小结与讨论

在嫁接试验中，用锡片箍住嫁接部位，嫁接口、接穗是裸露的，不是传统的薄膜密封或只露芽眼包扎，必须采用覆盖薄膜的拱棚，并及时将嫁接的营养杯苗置于棚内保湿，同时保持营养杯内土壤湿润，不要过湿或过干。另外，在自然环境下应适当遮阴、通风，避免棚内高温、高湿和太阳直射，否则苗易感染疫霉病或炭疽病而导致死苗严重。

整体而言，5—10 月均能进行猕猴桃嫩砧嫁接，且成活率在 80% 以上。综合猕猴桃嫁接苗萌芽后的生长情况，以 6 月 14 日嫁接的猕猴桃苗成活率和保存率相对最高，出苗时间相对最短，生长相对较旺且茎粗最粗。通过猕猴桃嫩砧嫁接，可使猕猴桃嫁接苗的出苗时间由传统方法的 2 年缩短至 1 年，大大提高了工作效率，同时也使猕猴桃的挂果时间提前，收益增加。须补充说明的是，由于整个嫁接试验的时间相对较长，砧木的茎粗也随时间的推移而逐渐增粗，后期嫁接使用的接穗也比早期的要粗，这将会对嫁接苗的生长产生一定影响。

参考文献：

[1]范成民，董丽芬，朱　帜，等. 核桃芽苗砧嫁接方法研究[J]. 西北林学院学报，2008，23(4)：109－111.

[2]王福森，刘　录，李　晶，等. 樟子松嫩枝嫁接技术研究[J]. 防护林科技，2010(3)：33－35.

[3]陈泽雄，娄　娟. 影响柑橘温室嫩芽嫁接成活率因素探讨[J]. 安徽农业科学，2007，35(18)：5403－5404.

（上接第 106 页）

[11]Elstner E F. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells[M]//Pelland E J，Steffen K L. Active oxygen/oxidative stress in plant metabolism. Rockville：American Society of Plant Physiologists，1991：13－25.

[12]Tan W，Liu J，Dai T，et al. Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post－anthesis water－logging[J]. Photosynthetica，2008，46(1)：21－27.

[13]Chance B，Maehly A C. Assay of catalases and peroxidases[J]. Methods in Enzymology，1955，2：764－775.

[14]Khanna－Chopra R，Selote D S. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought－resistant than－susceptible wheat cultivar under field conditions[J]. Environmental and Experimental Botany，2007，60(2)：276－283.

[15]Paradiso A，Berardino R，de Pinto M C，et al. Increase in ascorbate－glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants[J]. Plant and Cell Physiology，2008，49(3)：362－374.

[16]徐田军，董志强，兰宏亮，等. 低温胁迫下聚糠萘合剂对玉米幼苗光合作用和抗氧化酶活性的影响[J]. 作物学报，2012，38(2)：352－359.

[17]刘玉凤，李天来，高晓倩. 夜间低温胁迫对番茄叶片活性氧代谢及 AsA－GSH 循环的影响[J]. 西北植物学报，2011，31(4)：707－714.

[18]张立军，宋广周，白　霜，等. H_2O_2 对不同大豆品种低温萌发及主要抗氧化酶活性的影响[J]. 大豆科学，2008，27(1)：97－100.

[19]吕军芬，郁继华. H_2O_2 浸种对西瓜耐冷性生理生化指标的影响[J]. 甘肃农业科技，2004(4)：30－32.

[20]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(1)：40－49.

[21]郭丽红，王定康，王德斌，等. 抗坏血酸和谷胱甘肽在小麦幼苗冷激诱导抗冷性中的变化[J]. 昆明学院学报，2007，29(4)：66－68.

[22]罗　娅. 低温胁迫与锻炼对草苟生理特性的影响和草每几丁质酶基因的克隆[D]. 雅安：四川农业大学，2007.