

2,4-表油菜素内酯(EBR)对菜用甘薯抗寒生理生化的影响

张小贝, 祝志欣, 南文卓, 孙言博, 朱国鹏*

(海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 菜用甘薯抗寒性能是其在早春及秋冬季作为蔬菜供应的重要制约因素。以徐菜薯1号菜用甘薯为实验材料, 通过对甘薯叶进行外源2,4-表油菜素内酯(EBR)喷施处理, 探究其对菜用甘薯抗寒生理生化的影响; 并对其诱导抗寒的机理进行研究。结果表明, 0.1 mg·L⁻¹的EBR处理下甘薯的抗寒性能最佳。与对照相比在8℃低温胁迫下的48 h内, 甘薯叶中3种抗氧化酶(CAT、POD和SOD)活性明显高于对照, 3种渗透调节物质(可溶性蛋白质、可溶性糖和脯氨酸)中可溶性蛋白的含量有大幅提高, 而细胞的损伤指标(电导率和MDA)的数值均低于对照。外源EBR处理提高了甘薯叶中抗氧化酶的活性及渗透调节物质的含量, 减少了细胞膜的损伤, 增强了菜用甘薯抵抗低温胁迫的能力。

关键词: EBR; 菜用甘薯; 低温胁迫; 抗寒生理生化

中图分类号: S632

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)03-0525-05

Effects of 2, 4-epibrassinolide (EBR) on cold resistance-related physiological-biochemical indexes of vegetable sweet potato

ZHANG Xiaobei, ZHU Zhixin, NAN Wenzhuo, SUN Yanbo, ZHU Guopeng

(Ministry of Education Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources/ Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: The cold intolerance greatly restricted the supply of vegetable sweet potato in early spring, autumn and winter. By using vegetable sweet potato 'Xucai-1', this research explored the effects of 2, 4-epibrassinolide (EBR) spraying treatment on the cold resistance-related physiological-biochemical indexes in sweet potato leaves under cold stress. Our results showed that spraying 0.1 mg·L⁻¹ EBR was most effective. Within 48 hours of cold stress (8℃), the activities of three anti-oxidases (CAT, POD and SOD) were significantly higher than those of the control. Of three osmotic adjustment substances (soluble protein, soluble sugar and proline), the level of soluble protein had greatly increased and the relative electrical conductivity and MAD content which represented the extent of cellular damage were lower compared with the control. Overall, exogenous EBR treatment could increase the activity of anti-oxidases and the content of osmotic adjustment substances, and reduce the cell membrane damage of sweet potato leaves. Spraying of EBR could enhance the resistance of vegetable sweet potato to cold stress.

Key words: EBR; vegetable sweet potato; cold stress; cold resistance-related physiological-biochemical indexes

菜用甘薯是指以甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 嫩梢或叶柄等作为食用部位的一种蔬菜专用型甘薯新品种, 营养成分丰富, 具有良好的营养保健价值, 被医学界列入抗癌蔬菜, 被营养学家誉为“长寿食品”^[1]。近年来, 菜用甘薯因其优越的食用及营养品质深得消费者喜爱, 种植面积逐年扩大。

但菜用甘薯性喜温, 不耐寒, 易受冷害, 气温低于15℃时茎叶生长停滞, 低于6~8℃则呈现萎蔫状, 经霜即枯死^[2]。南方地区冬季的低温冷害不利于甘薯的生长, 导致甘薯的茎叶干枯、冻伤和死苗^[3]; 北方地区冬季一般采用设施栽培, 但甘薯叶在早春和秋季都易受到低温冷害的影响。寻找简单有效的

收稿日期: 2016-09-01

基金项目: 热作无公害生产技术集成与示范推广(15RZNJ-57)和优质富硒菜用甘薯周年生产技术示范与推广(HNXH201530)共同资助。

作者简介: 张小贝, 硕士研究生。E-mail: 1169683249@qq.com

* 通信作者: 朱国鹏, 研究员。E-mail: guopengzhu@163.com

方法缓解低温胁迫对菜用甘薯的影响具有重要的应用价值。

油菜素内酯 (brassinolide, BR) 被誉为植物的第 6 激素, 在植物体内含量极低, 但生理活性大大超过现有的 5 种激素, 极低浓度的表达即可提高植物的抗逆性, 如抗旱性、抗寒性和抗毒性, 属于高效、广谱且无毒的植物生长激素^[4-5]。在处于逆境胁迫时, 植物细胞内自由基的产生与清除处的动态平衡被破坏, 常导致自由基的积累, 进而破坏细胞膜的完整性, 使膜脂过氧化产物 MDA 增加, 电解质外渗, 严重时会导致细胞死亡。油菜素内酯的具体作用原理包括促进植物蛋白质合成、提高酶的活性, 并参与其他许多生理过程, 增强植物对环境胁迫的抵抗力^[6-7]。近年来, 许多学者对油菜素内酯在不同作物上的应用进行了大量研究, 但在甘薯上的应用少有报道。吴少华^[8]的研究表明, BR 处理能提高草莓叶片在干旱条件下 SOD 和 POD 等活性氧清除酶的活性, 可减轻干旱造成的伤害。王廷芹等^[9]的研究发现适宜浓度的油菜素内酯可增强青花菜叶片的细胞保护酶 (SOD、POD 和 CAT) 活性和脯氨酸含量, 提高植株的抗逆能力。黄玉辉等^[10]的研究表明在低温胁迫下, 外源 BR 处理通过调节苦瓜叶片的生理代谢, 可以稳定膜系统的结构和功能, 增强植株抗低温胁迫能力。

本研究以菜用甘薯品种徐菜薯 1 号水培苗为实验材料, 通过对甘薯叶进行外源 2,4-表油菜素内酯 (epibrassinolide, EBR) 喷施处理, 探究其在低温胁迫下各种抗寒相关的生理生化指标的变化。检测的指标包括 POD 酶 (过氧化物歧化酶)、CAT 酶 (过氧化氢酶)、SOD 酶 (超氧化物歧化酶)、可溶性糖、脯氨酸、可溶性蛋白和 MDA (丙二醛) 的含量及相对电导率。其中 POD、CAT 和 SOD 为 3 种抗氧化酶, 可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白为渗透调节物质, MDA 为膜脂过氧化产物, 细胞的损伤可导致 MDA 和相对电导率数值的升高。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 供试的菜用甘薯品种为徐菜薯 1 号, 引自徐州甘薯研究中心, 种植于海南大学教学实践基地。

1.1.2 仪器 光照培养箱; 北京普析通用仪器有限责任公司 VIS-7220 紫外线分光光度计; 常州菲普实验仪器厂 HH-60A 恒温水浴锅; 北京赛多利斯科学仪器有限公司 BSA323S 电子分析天平; 德国

Thermo Fisher ST16R 台式离心机。

1.2 试剂

EBR: 购自于北京索莱宝生物科技有限公司。

EBR 喷施液配制: 喷施前 EBR 用 98%乙醇溶解后用水稀释到适宜浓度, 乙醇终含量为 0.1% (V/V), 并加入吐温-80 作为展开剂, 最终含量为 0.1% (V/V)。同时制备清水对照, 往水中加入 98%乙醇和吐温-80 至终含量为 0.1% (V/V) 和 0.1%(V/V)^[11]。

1.3 实验方法

1.3.1 材料处理 (1) 材料预培养。取生长状况基本一致的苗移植于盛有 1/2 Hoagland 营养液培养的 500 mL 玻璃瓶中, 每瓶 1 株。在光照培养箱中预培养 1 周后进行实验处理。营养液每隔 2 d 换 1 次, 光照强度为 2 000 lx, 湿度为 85%, 白天温度 28℃, 夜晚温度 20℃, 光暗各 12 h。

(2) EBR 喷施处理。按实验设计配制各浓度的 EBR 喷施液及清水对照, 对甘薯叶片正反面进行喷施处理, 第 1 次喷施后隔 1 d 进行第 2 次喷施处理, 共计喷施 2 次。之后将材料移入光照培养箱中进行低温胁迫 (5℃或 8℃, 光强 2 000 lx, 光暗各 12 h)。

(3) 不同 EBR 浓度喷施的实验设计。预培养后, 选长势基本一致的植株, 分为 5 组, 每组 5 株设 3 次重复, 分别用 0、0.01、0.1、0.5 和 1 mg·L⁻¹ 的 EBR 喷施处理, 5℃低温下胁迫处理 12 h, 之后选取植株的第 2~3 个完全展开叶, 去中脉后剪碎混匀, 用于检测 CAT 酶活性、可溶性糖和可溶性蛋白质含量这些与抗寒相关的生理指标, 以确定 EBR 最佳施用浓度。

(4) 冷胁迫不同时间的实验设计。预培养后, 选长势基本一致的植株, 分为 2 组处理, 一组为对照, 另一组用 0.1 mg·L⁻¹ 的 EBR 喷施, 实验设 3 次重复, 每重复 5 株。在培养箱中 8℃低温胁迫处理, 并在处理 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h 和 48 h 后, 选取植株的第 2~3 个完全展开叶, 去中脉后剪碎混匀, 一部分样品称量后装入小封口袋液氮速冻后立即放入 -80℃ 冰箱保存用于检测抗氧化酶活性, 另一部分测定可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸、丙二醛的含量及相对电导率, 初步探究 EBR 诱导菜用甘薯抗寒性的生理生化机制。

1.3.2 抗寒相关的生理生化指标测定 POD 活性测定采用愈创木酚法^[12];

CAT 活性测定。采用过氧化氢还原法测定^[13];

SOD 活性测定。采用 Spycbaha J P 的方法^[14];

脯氨酸含量。采用酸性茚三酮法^[12];

可溶性蛋白含量测定。采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[12];

丙二醛可溶性糖含量。测定采用硫代巴比妥比色法^[15-16];

相对电导率测量。测定采用电导仪法^[17];

1.4 数据统计与分析

数据统计采用 Excel 进行统计,并用 DPS 进行相关分析并用邓肯氏法进行多重比较,差异显著性用不同大小写字母表示。

2 结果与分析

2.1 不同 EBR 浓度喷施对菜用甘薯部分抗寒生理生化指标的影响

由表 1 可知,5 种浓度 EBR 处理的菜用甘薯幼

苗的 CAT 酶、可溶性糖和蛋白质的含量均显著高于对照组,其中 0.1 mg·L⁻¹ 浓度的 EBR 处理的甘薯叶中以上指标增长最大与对照及其他浓度处理达到极显著水平 ($P < 0.01$),更高浓度的 EBR 处理,效果反而有所降低。可见,0.1 mg·L⁻¹ 的 EBR 处理下甘薯的抗寒性能最佳。

2.2 EBR 喷施对菜用甘薯抗寒生理生化的影响

对甘薯叶片用 0.1 mg·L⁻¹ 的 EBR 喷施后进行 8 °C 低温胁迫处理,并分别在 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h 和 48 h 取样,测定甘薯叶片中与抗寒性相关的指标。相较于之前实验,本设计测量的指标更为全面,包括 POD 酶、CAT 酶、SOD 酶、可溶性糖、脯氨酸、可溶性蛋白、MDA 的含量和相对电导率,各项指标的趋势如图 1~图 8 所示。

表 1 不同浓度 EBR 处理对菜用甘薯叶片中 CAT 酶活性、可溶性糖及蛋白质含量的影响
Table 1 Effects of different concentrations of EBR on CAT activity, soluble sugar and protein content

EBR 浓度/ mg·L ⁻¹ EBR concentration	CAT 酶活性/ U·(g·min) ⁻¹ CAT activity (FW)	可溶性糖含量/ μmol·g ⁻¹ Soluble sugar content (FW)	可溶性蛋白含量/ mg·g ⁻¹ Soluble protein content (FW)
0 (CK)	123.3 ^{eD}	182.9 ^{dD}	9.4 ^{eC}
0.01	140.7 ^{dD}	211.1 ^{cC}	11.8 ^{dC}
0.1	288.0 ^{aA}	335.5 ^{aA}	26.2 ^{aA}
0.5	226.7 ^{bB}	273.4 ^{bB}	20.6 ^{bB}
1	184.4 ^{cC}	191.9 ^{dCD}	18.2 ^{bB}

注:不同小写字母表示各处理指标间与对照相比在 $P < 0.05$ 水平上差异显著;不同大写字母表示各处理间与对照相比在 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

Note: Compared with CK different small letters followed by the same index indicate significant different at $P < 0.05$; different capital letters indicate significant difference at $P < 0.01$.

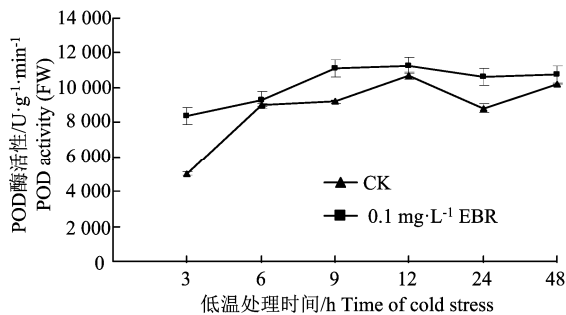


图 1 低温胁迫下甘薯叶 POD 酶活性变化

Figure 1 Effects of EBR on POD activities in sweet potato leaves under cold stress

2.2.1 EBR 喷施对菜用甘薯抗氧化酶活性的影响
结果显示,经 EBR 处理的叶片 3 种抗氧化酶活性明显高于对照 (图 1~图 3),与对照相比 POD 酶活性平均提高 20.33%,CAT 酶活性平均提高 16.91%,SOD 酶活性平均提高 7.26%。从时间的角度,POD 含量在冷胁迫 9 h 内呈上升趋势,之后活性较平稳,并稍有下降 (图 1)。CAT 的活性在冷胁迫迅速增加在 6 h 后达到最大值,然后呈下降趋势,EBR 处理

组 CAT 活性总体上大于对照 (图 2)。SOD 含量在冷胁迫 6 h 内迅速上升,之后开始下降,并在 12 h 时有所增加,之后呈下降趋势 (图 3)。由此推测,在冷胁迫前期,菜用甘薯自身可通过 POD 和 SOD 含量的上升来抵御活性氧,EBR 处理总体上增加了 POD、SOD 和 CAT 3 种抗氧化酶的活性。

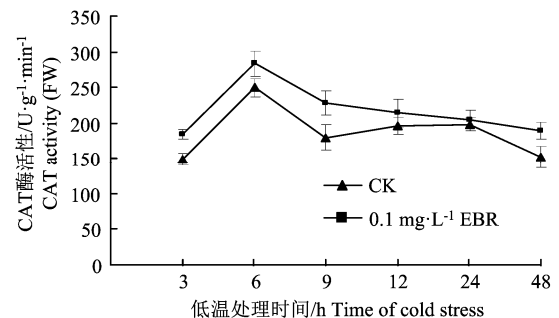


图 2 低温胁迫下甘薯叶 CAT 酶活性变化

Figure 2 Effects of EBR on CAT activities in sweet potato leaves under cold stress

2.2.2 EBR 喷施对菜用甘薯渗透调节物含量的影响
结果显示,经 EBR 处理的叶片可溶性糖和脯氨酸含

量在冷胁迫前 12 h 稍高于对照,但在之后含量降低至与对照相同或低于对照(图 4~图 5),与对照相比可溶性糖平均提高 8.22%,脯氨酸平均提高 9.36%,可溶性蛋白质平均提高 42.14%。在冷胁迫前 6 h,EBR 处理组中可溶性蛋白的含量与对照类似,但在 9~48 h 后,EBR 处理组中可溶性蛋白的含量大幅增加,远高于对照组(图 6)。由此推测,在冷胁迫中,EBR 过大量增加甘薯叶中可溶性蛋白的含量等来增加细胞的抗渗透性。

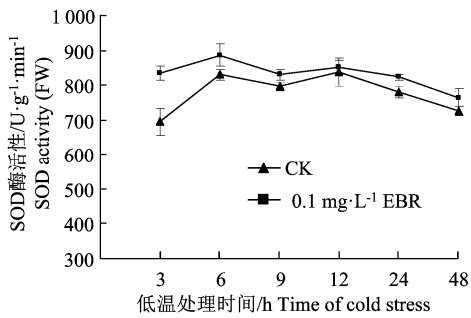


图 3 低温胁迫下甘薯叶 SOD 酶活性变化

Figure 3 Effects of EBR on SOD activities in sweet potato leaves under cold stress

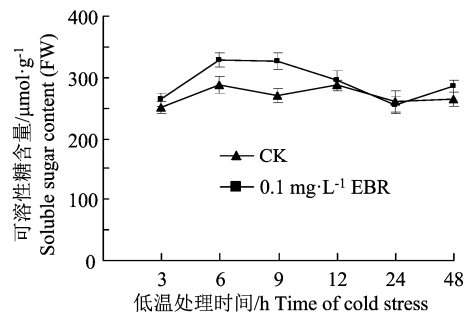


图 4 低温胁迫下甘薯叶可溶性糖含量变化

Figure 4 Effects of EBR on soluble sugar content in sweet potato leaves under cold stress

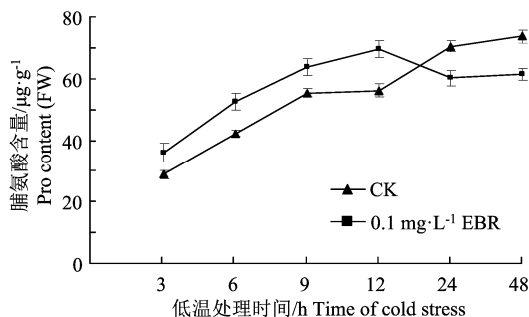


图 5 低温胁迫下甘薯叶脯氨酸含量变化

Figure 5 Effects of EBR on Pro content in sweet potato leaves under cold stress

2.2.3 EBR 喷施对菜用甘薯细胞损伤的影响 结果显示,冷胁迫下 MDA 含量和相对电导率的变化趋势在对照组和 EBR 处理组完全相同。其中 MDA 含量先增后减,但幅度不大,对照组的 MDA 含量始

终稍高于 EBR 处理组(图 7)。2 组甘薯叶片的相对电导率在前 12 h 迅速由 25%左右增加到 80%左右,之后稍有浮动,但对照组的相对电导率始终稍高于 EBR 处理组(图 8)。总的来说,EBR 处理可以一定程度的缓解细胞损伤。

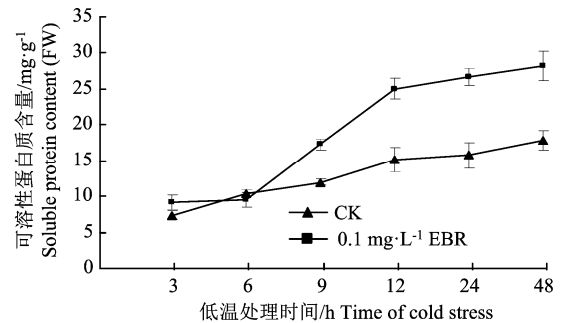


图 6 低温胁迫下甘薯叶可溶性蛋白含量变化

Figure 6 Effects of EBR on soluble protein content in sweet potato leaves under cold stress

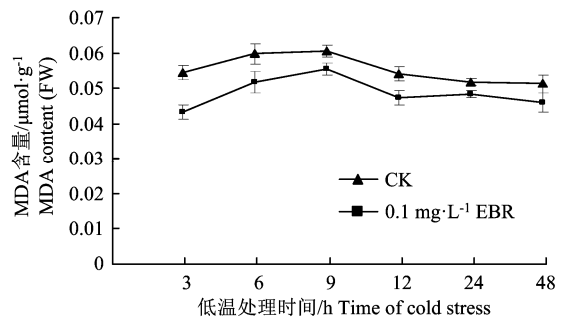


图 7 低温胁迫下甘薯叶 MDA 含量变化

Figure 7 Effects of EBR on MDA content in sweet potato leaves under cold stress

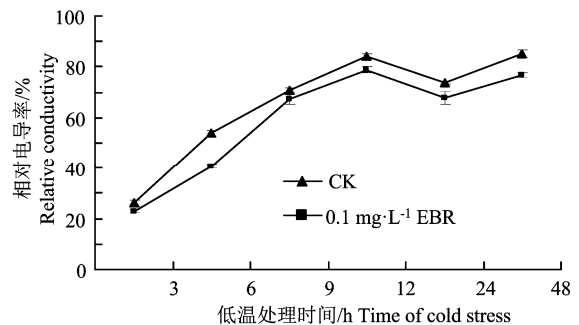


图 8 低温胁迫下甘薯叶相对电导率变化

Figure 8 Effects of EBR on relative conductivity in sweet potato leaves under cold stress

3 讨论

温度是植物生长的必要条件,而低温胁迫则会严重限制植物的生长。细胞膜是植物冷害的敏感部位,低温胁迫会引起质膜受损伤,使得质膜的通透性增加,导致细胞内溶质外渗,而膜脂过氧化则是造成膜受损伤的关键因素。抗氧化酶活性的增加可缓解活性氧带来的损伤,过氧化物酶(POD)、过氧

化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 是植物体内活性氧自由基清除系统的保护酶, 它们协同作用可以防御活性氧自由基对细胞膜造成的伤害, 抑制膜脂过氧化, 减轻逆境胁迫对植物细胞造成的伤害^[18]。逆境胁迫下植物细胞内正常的代谢活动会发生变化, 使之趋向积累一些渗透调节物质, 通过渗透调节来维持细胞膨压对某些生理功能的调控作用, 缓解逆境胁迫对植物造成的伤害^[19-20]。脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白是植物体内重要的渗透调节物质。低温是菜用甘薯在早春及秋冬季作为蔬菜供应的重要制约因素, 寻找简单有效的方法缓解低温胁迫对菜用甘薯的影响具有重要的应用价值。油菜素内酯是一种生理活性很强的天然油菜素甾醇类化合物, 可以缓解各种胁迫对植物体造成的伤害^[21], 其在提高作物耐冷性方面表现出良好的效果^[22]。其作用方式可能是通过 Ca^{2+} 及钙信使系统或激素类作用来调节抗冷力的形成, 阻止植物幼苗产生过多的自由基, 或诱导形成较多的自由基清除剂来减轻膜脂过氧化作用, 从而稳定膜的结构与功能, 增强膜的防卫能力, 以适应低温逆境的变化, 促进生长^[23]。

本研究通过在徐菜薯 1 号水培苗上进行的外源 2,4-表油菜素内酯 (EBR) 喷施处理, 在 8℃ 低温下进行胁迫, 通过测定甘薯叶中多种与抗寒相关的生理生化指标的变化来研究外源 EBR 对菜用甘薯抗寒性的影响。在实验条件下, 菜用甘薯受 8℃ 低温胁迫时, 菜用甘薯苗的冷伤害有所缓解。可通过提高 CAT、POD 及 SOD 这些抗氧化酶的活性, 清除植物体内的活性氧自由基, 抑制了膜脂氧化产物 MDA 的含量, 减轻了低温诱导的氧化性损伤。而在脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白这些植物体内重要的渗透调节物质都有所提高, 其中外源 EBR 处理大大增加了甘薯叶中可溶性蛋白的含量, 可溶性蛋白具有较强的亲水性, 能增加细胞内束缚水的含量, 降低冰点, 防止低温下因组织结冰而造成的植株死亡。相对电导率和 MDA 含量的数值是细胞损伤的代表, 对它们的测定也显示, 外源 EBR 喷施可抑制低温胁迫下菜用甘薯细胞脂质过氧化作用, 减少细胞膜因脂质过氧化作用引起的低温损伤, 保护了细胞膜的结构完整性。以上结果与前人在其他作物上的研究结论一致^[10-11,24]。总之, 外源的 EBR 处理通过多样的作用机制, 增加了菜用甘薯对于低温的抗性。本研究结果可为生产中寻找简便而有效的提高菜用甘薯抗寒性的方法提供了一定的理论依据和技术支持。

参考文献:

- [1] 杨士辉. 值得开发的营养保健蔬菜——甘薯茎尖[J]. 蔬菜, 1999 (3): 16.
- [2] 江苏省农业科学院, 山东省农业科学院. 中国甘薯栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 50-52.
- [3] 张雄坚, 房伯平, 陈景益, 等. 甘薯资源耐寒性调查[J]. 广东农业科学, 2008(增刊): 67-68.
- [4] XIA X J, WANG Y J, ZHOU Y H, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber[J]. Plant Physiol, 2009, 150(2): 801-814.
- [5] 王红红, 李凯荣, 侯华伟. 油菜素内酯提高植物抗逆性的研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(3): 214-219.
- [6] BAJGUZ A, HAYAT S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses[J]. Plant Physiol Bioch, 2009, 47(1): 1-8.
- [7] AHAMMED G J, YUAN H L, OGWENO J O, et al. Brassinosteroid alleviates phenanthrene and pyrene phytotoxicity by increasing detoxification activity and photosynthesis in tomato[J]. Chemosphere, 2012, 86(5): 546-555.
- [8] 吴少华. BR 和 KT 对草莓抗旱性的影响[J]. 福建农业学报, 2001, 16(2): 56-58.
- [9] 王廷芹, 杨暹. 油菜素内酯对青花菜叶片中几种酶和产量的影响[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 15-17.
- [10] 黄玉辉, 黄如葵, 陈小凤, 等. 油菜素内酯对苦瓜抗冷性生理指标的影响[J]. 南方农业学报, 2012, 43(5): 592-596.
- [11] 惠竹梅, 王智真, 胡勇, 等. 2,4-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(5): 1005-1013.
- [12] 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.
- [13] AEBI H. Catalase in vitro[J]. Method Enzymol, 1984, 105(13): 121-126.
- [14] SPYCHALLA J P, DESBOROUGH S L. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers[J]. Plant Physiol, 1990, 94(3): 1214-1218.
- [15] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 305-306.
- [16] 张治安, 陈展宇. 植物生理实验技术[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2008: 192-193.
- [17] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [18] LIMÓN-PACHECO J, GONSEBATT M E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress[J]. Mutat Res-Gen Tox En, 2009, 674(1): 137-147.
- [19] BAJGUZ A. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*[J]. Plant Physiol Bioch, 2000, 38(3): 209-215.
- [20] 康云艳, 杨暹, 郭世荣, 等. 2,4-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗碳水化合物代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(12): 2495-2503.
- [21] KRISHNA P. Brassinosteroid-mediated stress responses[J]. J Plant Growth Regul, 2003, 22(4): 289-297.
- [22] 骆炳山, 屈映兰, 刘道宏. 油菜素内酯在作物上的应用及生理效应与评价[J]. 华中农业大学学报, 1992, 11(1): 41-47.
- [23] 陈善娜, 刘继梅. 抗寒剂和高油菜素内酯对高原水稻抗冷性的影响[J]. 云南植物研究, 1997, 19(2): 184-190.
- [24] 康云艳, 郭世荣, 段九菊, 等. 2,4-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜根系抗氧化系统及无氧呼吸酶活性的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(5): 535-542.