

## 冬季低温胁迫对油菜抗寒生理特性的影响

张晓红, 冯梁杰, 杨特武, 徐正华, 胡立勇\*

华中农业大学植物科学技术学院, 农业部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室, 武汉430070

**摘要:** 以4个甘蓝型油菜品种为试验材料, 在大田栽培条件下研究冬季自然低温对油菜功能叶脯氨酸、可溶性糖(SS)、可溶性蛋白(SP)、丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)酶活性的影响。结果表明, 日均温降至5℃以下, 多数生理指标出现升高或降低现象, 至3℃以下开始表现一定的生理性伤害, 0℃以下则伤害加重。不同生理指标对低温的反应有不同, 随着日均温降低至5℃以下, 脯氨酸和可溶性糖含量上升, 二者均在日均温降至0℃以下时达到最大值; 而CAT活性在日均温降至5℃左右时明显升高并出现最大值, SOD活性则在3℃左右达到最高; SP、MDA含量在日均温降至10、5和0℃时呈先下降后上升的趋势。不同生理指标比较, 以功能叶可溶性糖含量随环境温度下降而迅速升高的反应最明显; 脯氨酸含量、SOD和CAT酶活性等指标能相对稳定地反应不同品种的抗寒性差异。根据不同品种在低温下的农艺性状表现及田间冻害指数, 结合生理指标变化差异, 认为4个品种中抗寒性相对较强的为‘华双5号’。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 低温胁迫; 冻害指数; 渗透调节物质; 抗氧化酶

## Effects of Chilling Stress on Physiological Characteristics of Rapeseed Seedlings in Winter

ZHANG Xiao-Hong, FENG Liang-Jie, YANG Te-Wu, XU Zheng-Hua, HU Li-Yong\*

Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River of Agriculture Ministry, College of Plant Science and Technology of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** Four cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) were used to determine the changes in proline, soluble sugar, soluble protein, malondialdehyde (MDA) contents and superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) activities of functional leaf under natural chilling stress in a field experiment. The results showed that most physiological indicators changed obviously in leaves when mean daily temperature decreased below 5℃ and physiological injury occurred when temperature was below 3℃, the injury became worse when temperature was below 0℃. Various physiological indicators showed different responses to low temperature in leaves. The contents of proline and soluble sugar increased when mean daily temperature decreased to 5℃ and reached the maximum when temperature was below 0℃. Nevertheless, CAT and SOD activity reached the highest when temperature dropped to 5℃, and 3℃, respectively. The contents of soluble protein and MDA showed a trend to decrease at first and then increase when mean daily temperature dropped to 10℃, 5℃ and 0℃. Amongst the physiological indicators, soluble sugar content was most sensitive to low temperature in functional leaves; proline content and SOD and CAT activity could relatively steadily reflect the cold tolerance of different cultivars. Combined the injury index and agronomic performances with physiological changes under low temperature of cultivars, ‘Huashuang 5’ showed highest tolerance to cold stress.

**Key words:** *Brassica napus*; chilling stress; freezing index; osmolyte; antioxidase

油菜是中国唯一的越冬油料作物, 适宜生长的温度为10~20℃, 过高或过低均会对油菜的生长发育造成不良影响。当冬季温度降至3℃以下时油菜便会生长停滞, -3~-5℃时3 d以上, 油菜叶片开始表现受冻症状, -7~-8℃时受害较重(刘后利1985)。长江流域冬季常有低于0℃的气温出现, 自2008年以来更是频繁出现低温冻害, 严重影响

了我国冬油菜的生产。因此, 研究油菜的抗寒机理已引起相关科学家的密切关注。

收稿 2015-02-04 修定 2015-04-13

资助 国家科技支撑计划(2010BAD01B01)和国家自然科学基金青年基金(4004-34113030)。

\* 通讯作者( E-mail: liyonghu@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87281393)。

低温对作物的伤害表现为外部特征、生长状态以及生理生化的系列变化。已有研究表明,植株抗寒性与体内可溶性糖(SS)、可溶性蛋白(SP)、游离脯氨酸(proline)等物质的含量及活性氧和自由基清除保护酶的活性密切相关。对玉米、小麦、水稻、草莓等作物的研究显示,一定范围内,脯氨酸、SS及SP含量随胁迫温度的降低与时间延长呈增加趋势,以耐寒品种的含量相对增加更多(王瑞等2008;李春燕等2011;宋广树等2011;Koehler等2012)。低温处理后,小麦、玉米、木薯的膜脂过氧化物丙二醛(MDA)含量与抗寒性强弱呈反比(王瑞等2008;刘艳阳等2006;Luo和Huang 2012)。一定低温条件下作物的活性氧和自由基清除保护酶活性有升高反应,但不同作物反应的低温条件及趋势有不同。如水稻在短期低温胁迫后超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性下降(王萍等2006);木薯和小麦则随低温胁迫时间延长或程度加重,过氧化物酶(POD)与CAT活性有先上升后下降的现象(康冬鸽等2009;李春燕等2011)。而对苜蓿的研究表明,抗性品种比敏感性品种的SOD有更高的活性(McKersie等1993)。不同研究者也先后开展了油菜的低温胁迫响应相关研究,发现受冻前后油菜脯氨酸、SS和SP含量明显增加,SOD、POD和CAT活性在短期低温胁迫下表现上升,但随胁迫程度的进一步增强出现下降(Zou等2007;杨宁宁等2014)。

不同作物与品种对热量的要求及对低温的敏感性存在差异,迄今有关作物对低温胁迫的生理生化反应及抗(耐)机制尚缺乏系统了解,同时前人的研究由于研究条件不同、低温持续时间不同,或持续时间较短,存在较多不一致或相互矛盾之处,因而难于进行准确比较与判断。本试验在大田栽培条件下,对油菜越冬前后及低温期间的相

关生理指标进行了连续测定,探究不同品种对气温变化及低温胁迫的生理响应,拟为进一步阐明油菜的抗寒机制提供一定的理论依据。

## 材料与方法

### 1 试验材料

试验材料的选择是在对长江中游大面积种植优良品种进行预备试验的基础上,筛选出生育期相近但抗寒性存在差异的4个甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品种进入本试验(表1)。其中2011~2012年度选用2个甘蓝型杂交油菜品种‘华油杂62’、‘华油杂9号’;2012~2013年度共选用4个品种,增加了2个甘蓝型常规种‘华双5号’、‘中双11号’。

### 2 试验设计

试验于2011~2012年度、2012~2013年度在华中农业大学校内试验田中进行(东经114°28'35.4",北纬30°28'40.7")。全年平均气温15~17℃,最冷月平均气温3℃,年平均降雨量1140~1265mm,年平均蒸发量1400~1570mm。试验田土壤类型为黄棕壤,前茬为水稻。土壤养分含量为铵态氮12.93 mg·kg<sup>-1</sup>,硝态氮4.70 mg·kg<sup>-1</sup>,速效磷11.36 mg·kg<sup>-1</sup>,速效钾158.87 mg·kg<sup>-1</sup>,pH为7.26。

两年试验在同一块试验田完成,前茬均通过种植水稻进行匀田,并在水稻种植前进行多次带水旋耕,油菜种植前根据测定土壤养分含量确定小区重复的布置方向,保证试验地土壤肥力均匀一致。进行东西行向等行距种植使各小区内光照相同,各小区水分等其他田间管理按常规同等进行。试验小区面积均为10 m<sup>2</sup>,随机区组设计,3次重复。两年分别于2011年10月8日、2012年10月4日播种,种植密度为30万株·hm<sup>-2</sup>,肥料施用量为纯N 180 kg·hm<sup>-2</sup>,P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 90 kg·hm<sup>-2</sup>,K<sub>2</sub>O 126 kg·hm<sup>-2</sup>,硼肥7.5 kg·hm<sup>-2</sup>。基肥:腊肥:薹肥以5:2:3的比例施

表1 试验所用油菜品种

Table 1 Rapeseed varieties used in the experiment

品种	选育单位	审定年份	品种来源
‘华油杂62’	华中农业大学	2010	2063A雄性不育系×05-P71-2恢复系
‘华油杂9号’	华中农业大学	2004	986A不育系×7-5恢复系
‘华双5号’	华中农业大学	2004	‘中油821’//‘华油3号’/RS-1双低选系×‘华双3号’/‘中双4号’
‘中双11号’	中国农业科学院油料作物研究所	2008	(‘中双9号’/2F10中间材料)/26102中间材料

用。小区内植株生长整齐一致。

### 3 试验方法

#### 3.1 冻害调查

冻害调查标准按照刘后利(1985)的方法进行。对调查植株逐株确定冻害程度, 冻害程度分0、1、2、3、4五级, 各级标准如下: 0级植株正常, 未受冻害; 1级仅个别大叶受害, 受害叶片局部萎缩呈灰白色; 2级有半数叶片受害, 受害叶片局部或大部萎缩、焦枯, 但心叶正常; 3级全部叶片大部受害, 受害叶局部或大部萎缩、焦枯, 心叶正常或受轻微冻害, 植株尚能恢复生长; 4级全部大叶和心叶均受冻害, 趋向死亡。分株调查后, 按刘后利(1985)的公式计算冻害指数: 冻害指数=[(1×S1+2×S2+3×S3+4×S4)/(调查总株数×4)]×100, 式中: S1、S2、S3、S4分别为表现1~4级冻害的油菜株数。

#### 3.2 取样及保存方法

2011~2012年度: 自日均温降至5℃以下时开始取样, 以后每隔6 d取一次样; 2012~2013年度: 油菜于田间正常管理生长至6~7片叶时开始采取功能叶(倒四叶)为测定样品, 以后每隔6 d取样一次。取样于每天早晨8:00左右进行。分析处理之前, 用冰盒保鲜。

用预冷的pH 7.8磷酸缓冲液进行酶液提取, 称取叶片(2011~2012年度: 液氮研磨后用超低温冰箱保存的样品; 2012~2013年度: 新鲜样品) 0.200 g左右的油菜功能叶在预冷的研钵中研磨, 加pH 7.8的磷酸缓冲液5 mL提取, 在4℃下, 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 即得提取液, 所得提取液用于测定可溶性蛋白含量, SOD、POD和CAT活性。

#### 3.3 测定方法

脯氨酸含量采用磺基水杨酸法(李合生2000);

MDA采用硫代巴比妥酸法(Bhatnagar-Mathur等2009); SP含量采用考马斯亮蓝G-250法(李合生2000); SS含量采用蒽酮比色法(李合生2000)。

SOD活性用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定(Donahue等1997); POD活性采用愈创木酚法测定(Raza等2007); CAT活性采用过氧化氢法测定(Bergmeyer 1965)。

#### 3.4 温度测定及气象资料来源

采用田间温度测定(温湿度记录仪, 每小时记录一次温度), 以及由湖北省气象局提供的武汉市江夏站点气象资料。

### 4 数据处理与分析

利用Microsoft Excel 2010进行数据处理和作图, 利用SPSS 19.0软件进行方差分析。

## 实验结果

#### 1 油菜苗期降水及日照时数情况

2011~2013年度武汉地区降水情况如表2。可以看出, 2012~2013年度降水量每月平均达到66.48 mm, 较2011~2012年度高65.9%, 雨量较为充沛。在低温取样期间, 2012年12月降水量达到63.87 mm, 降雨降温情况明显。

2011~2013年度武汉地区日照时数情况如表2。可以看出, 日照时数两年情况基本一致, 但2012~2013年度10月份到2月份日照时数平均达到119.61 h, 较2011~2012年度高14.90 h。

#### 2 油菜越冬期间的温度变化

武汉地区每年均会出现低于5℃的低温, 但不同年份低温的持续时间不同。2011~2013年度油菜越冬期间的温度分析表明, 低于5℃以下的低温在2011~2012年度出现11 d, 2012~2013年度出现了23 d。

表2 油菜苗期的降水及日照时数情况(2011~2013)

Table 2 The precipitation and sunshine of rapeseed seeding stage (2011-2013)

月份	降水量/mm		日照时数/h	
	2011~2012年度	2012~2013年度	2011~2012年度	2012~2013年度
10	46.83	137.82	135.09	119.13
11	35.31	59.01	146.01	130.29
12	5.91	63.87	121.35	96.09
1	32.13	11.70	46.74	60.54
2	80.28	60.00	74.37	192.00
平均值	40.09	66.48	104.71	119.61

本试验在2011~2013年度油菜生长期进行。2011~2012年度油菜越冬期的温度普遍较高(图1), 第一次取样的12月10日最低温降至0 °C以下, 随后日均温基本都在5 °C以上, 只有2012年1月3日至1月9日的日均温有4 d在3 °C左右, 最低温基本在0 °C以上。由于相对气温较高, 因而本年度的油菜低温胁迫程度不高。

2012~2013年度冬季的温度变化幅度较大。日均温度在11月16日首次降至10 °C以下, 12月2日降至5 °C以下, 12月20日降至3 °C以下, 此后直至1月6日持续了16 d的3 °C以下低温, 在此期间日最低温多数在0 °C以下, 尤其是12月31日、1月4日的最低温分别达到-3.3、-4.1 °C。1月13日之后, 日均温回复至5 °C以上, 油菜恢复生长; 10 °C以上油菜

进入抽薹期。本年度进入冬季后, 温度呈阶段性下降, 并具有较长时间的零下低温出现, 因此, 本文主要以2012~2013的数据加以分析与讨论。

### 3 油菜低温冻害及农艺性状情况调查

#### 3.1 油菜低温冻害情况调查

2012~2013年度于低温胁迫最严重时(1月6日)田间调查不同品种的冻害情况(表3), 每个小区采用五点采样法进行冻害调查并分级, 计算冻害指数。由表3可以看出, ‘华双5号’冻害最轻, 冻害指数为17, ‘中双11号’冻害最重, 达到39。

2011~2012年度由于未出现0 °C以下的日均温, 最低温仅有4 d处于0 °C以下, 油菜冻害较轻。田间调查冻害指数结果可以看出, ‘华油杂62’为5, ‘华油杂9号’为7。

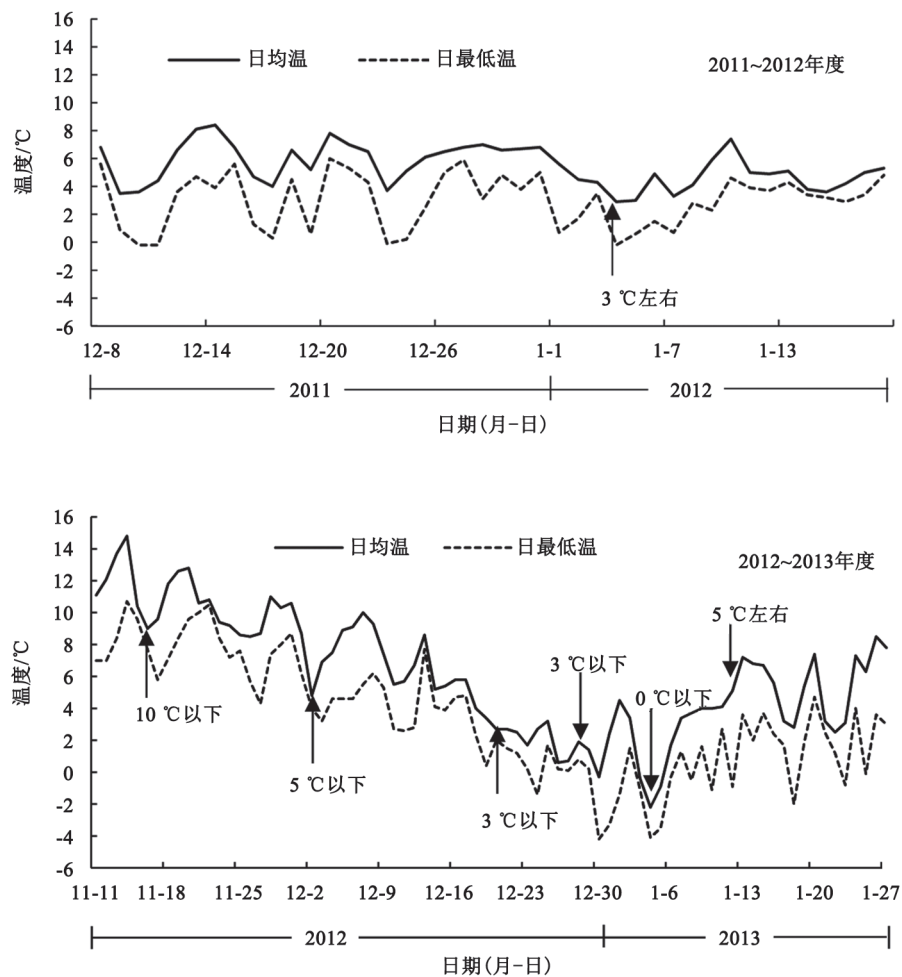


图1 2011~2013年油菜越冬期间温度变化

Fig.1 Temperature changes of rapeseed wintering period in 2011-2013

表3 低温条件下不同品种冻害指数比较(2011~2013)

Table 3 Freeze injury performance of different varieties in the most severe cold stress (2011–2013)

品种	冻害指数	
	2011~2012年度	2012~2013年度
‘华油杂62’	5	20
‘华油杂9号’	7	24
‘华双5号’		17
‘中双11号’		39

调查日期分别为2011年12月20日和2013年1月6日, 调查株数50株。

### 3.2 油菜低温前后农艺性状情况调查

2012~2013年度于低温冻害前后调查不同品种的农艺性状情况(表4), 每个小区计算平均数。由表4可以看出, 在平均日均温为1.98 °C期间, 农艺性状指标增长缓慢, 但‘华双5号’株高生长最快, 差值达0.8 cm, 其次‘华油杂62’达0.6 cm, ‘华油杂9号’和‘中双11号’生长最慢, 差值为0.4 cm。同时可

以看出, ‘华双5号’绿叶数增长最快, 差值达2.0片, 其次‘华油杂62’达1.8片, ‘华油杂9号’和‘中双11号’生长最慢, 差值为1.2片。比较低温条件下的生长表现, 认为‘华双5号’抗寒性较强, 其次为‘华油杂62’, ‘华油杂9号’和‘中双11号’相对较弱。

## 4 低温期功能叶渗透物质消长变化

### 4.1 脯氨酸含量变化

2012~2013年度功能叶测定结果显示(图2), 冬季日均温下降至5 °C前, 脯氨酸含量处于较低水平, 不同品种含量在0.27~0.42 μmol·g<sup>-1</sup> (FW)之间。至12月9日温度下降至5 °C以下, 脯氨酸含量小幅上升至1.52~3.65 μmol·g<sup>-1</sup> (FW), 其中‘华双5号’和‘华油杂62’脯氨酸含量显著高于‘华油杂9号’和‘中双11号’(P<0.05); 随后温度回升而下降; 在12月23日至1月13日低温胁迫持续期, 脯氨酸含量持续升高, 在1月6日温度降至0 °C以下时达到最大值, 范围在11.48~18.34 μmol·g<sup>-1</sup> (FW)之间; 以‘华双5号’的脯氨酸含量显著高于其他3个品种(P<0.05)。

表4 低温条件下不同品种农艺性状比较(2012~2013)

Table 4 Agronomic traits performance of different varieties in the most severe cold stress (2012–2013)

品种	株高/cm			绿叶数/片		
	冻前	冻后	差值	冻前	冻后	差值
‘华油杂62’	17.0	17.6	0.6	7.8	9.6	1.8
‘华油杂9号’	9.0	9.4	0.4	7.8	9.0	1.2
‘华双5号’	12.6	13.4	0.8	6.4	8.4	2.0
‘中双11号’	13.4	13.8	0.4	9.4	10.6	1.2
平均值	13.0	13.55	0.55	8.2	9.4	1.6

冻前数据调查时间为2012年12月23日, 冻后数据调查时间为2013年1月11日。

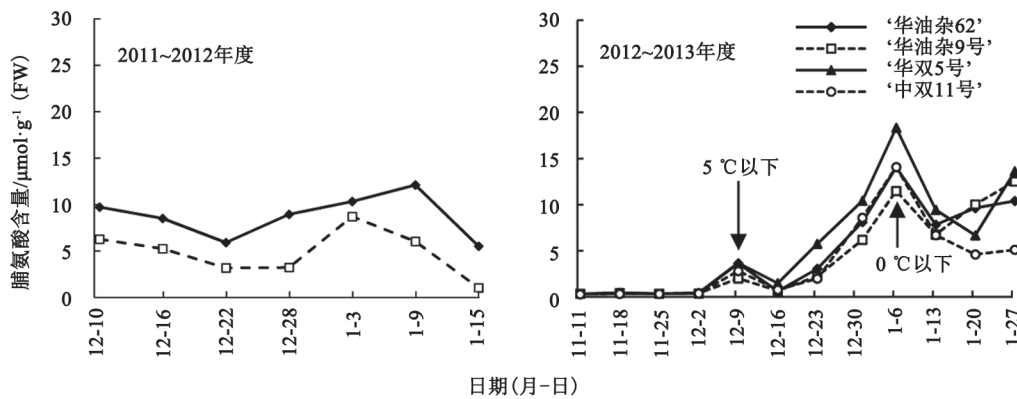


图2 油菜叶片脯氨酸含量变化

Fig.2 Changes of proline content in the leaves of rapeseed

2011~2012年度的测定结果也表明,当温度在12月10日突然下降至0℃以下时,两个品种的脯氨酸含量达到6~10  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW);在1月3日至9日出现3℃以下的日最低温时,两个品种先后升到最大值9~14  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW),且‘华油杂62’的含量高于‘华油杂9号’。

#### 4.2 可溶性糖(SS)含量变化

2012~2013年度冬季气温在10℃以上时,SS含量维持在一个较低水平,范围为4.21%~7.75% (图3)。当日均温度降至10、5、0℃以下时,SS含量均相应出现上升;在12月30日均温达到0℃以下时的最大值,不同品种在15.00%~24.04%之间(图3)。不同抗性品种间的变化规律性不明显,但抗性较弱的‘中双11号’在整个降温过程中多数时间处于最低水平。当日均温回复至5℃以上后,可溶性

糖含量继续上升,但此时的升高应该与油菜进入阶段发育有关。

2011~2012年度SS变化规律基本一致,在低温胁迫最严重时含量达到最大值;但由于当年冬季气温相对较高,最低气温均在-1℃以上,0℃以下低温不仅出现时间少而短,而且迅速回升至3℃以上,气温相对平稳。因而可溶性糖含量明显低于2012~2013年度,同时抗寒性较强的‘华油杂62’也仅在初始降温时高于稍弱的‘华油杂9号’。

#### 4.3 可溶性蛋白(SP)含量变化

2012~2013年度在日最低温降至10、5、0℃以下时,SP含量先降低,随后上升(图4)。在日均温降至3℃以下后达到最大值(12月23日),不同品种在23.90~31.35  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)之间,且‘华双5号’显著高于其他3个品种( $P<0.05$ )。低温结束后,品种间

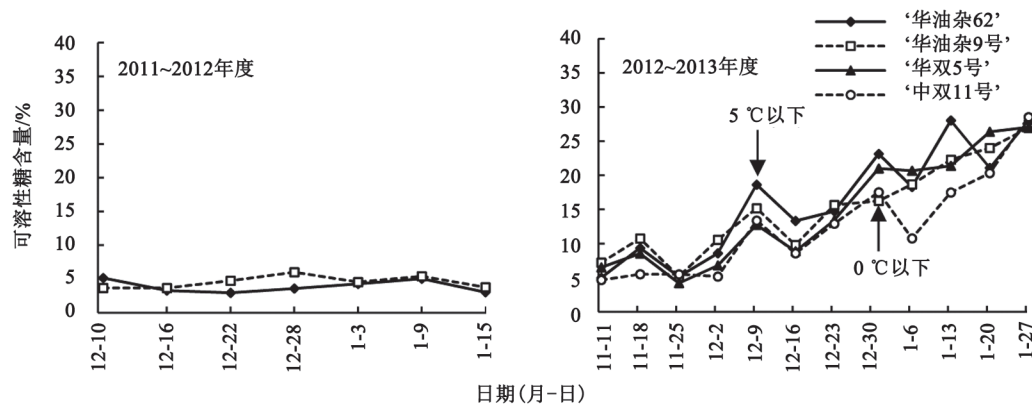


图3 油菜叶片可溶性糖含量变化

Fig.3 Changes of soluble sugar content in the leaves of rapeseed

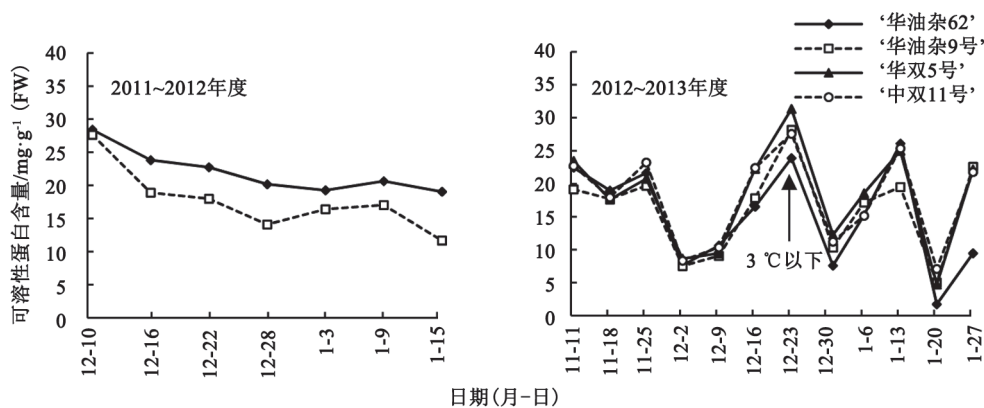


图4 油菜叶片可溶性蛋白含量变化

Fig.4 Changes of soluble protein content in the leaves of rapeseed

有不同的升降变化, 也应该与各品种的生育进程不同有关系。

2011~2012年度12月10日在温度骤降时SP含量表现较高水平, 之后变化不大, 即当年的低温未造成明显伤害。‘华油杂62’的含量一直高于‘华油杂9号’。

### 5 低温期功能叶膜脂过氧化物产物MDA消长变化

2012~2013年度, 当日最低温分别降至10、5 °C时, 膜脂氧化的产物MDA也与可溶性蛋白一样表现出先下降后再上升趋势(图5)。以遭遇0 °C以下持续低温后上升趋势最为明显, 至2013年1月13日达到最大值, 不同品种在59.97~73.92 nmol·g<sup>-1</sup> (FW)之间(图5); 其中以‘华双5号’的MDA含量相对较低, 但不同品种之间差异不显著( $P < 0.05$ )。

2011~2012年度规律类似, 在1月3日低温胁迫

最严重时, 两个品种MDA含量先降低, 随后在1月9日达到最大值, 且抗寒性较强的‘华油杂62’含量较低。

## 6 低温期功能叶抗氧化酶活性强弱变化

### 6.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

2012~2013年度, 随着日均温下降至10、5、3 °C以下3个不同的低温阶段, SOD活性出现3次上升峰值(图6); 在3 °C以下时达到最大峰值, 此时不同品种的SOD活性在843.6~854.2 U·g<sup>-1</sup> (FW)之间, 品种间差异不显著。当日均温持续在0 °C以下期间, SOD活性降低至最低水平, 不同品种在406.0~560.6 U·g<sup>-1</sup> (FW)。此时的低温胁迫程度可能造成了SOD活性下降或失活。在0 °C以下持续期间以‘华双5号’SOD活性显著高于‘华油杂62’和‘中双11号’, ‘中双11号’则显著低于其他3个品种( $P < 0.05$ )。低温结束后, 不同品种SOD活性回复至低温前水平。

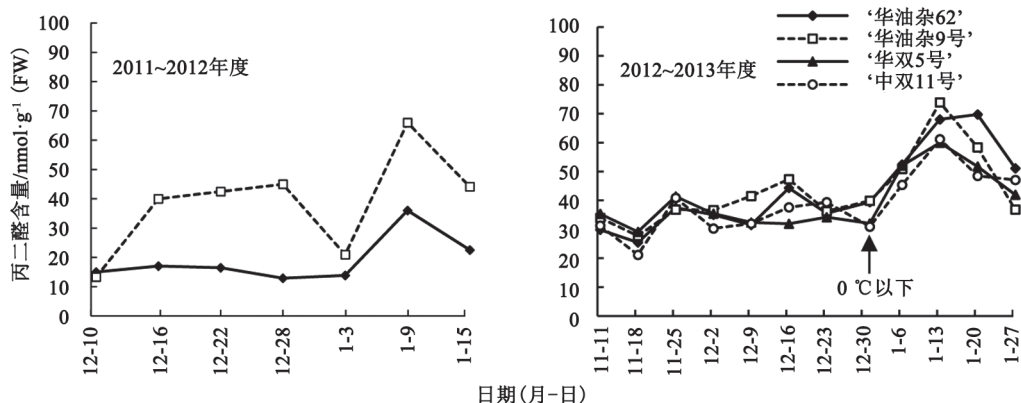


图5 油菜叶片丙二醛含量变化

Fig.5 Changes of MDA content in the leaves of rapeseed

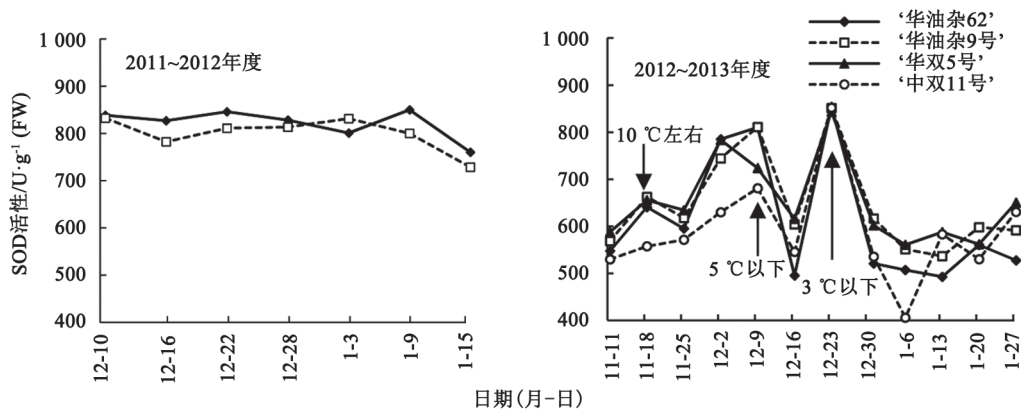


图6 油菜叶片SOD活性变化

Fig.6 Changes of SOD activity in the leaves of rapeseed

2011~2012年度油菜越冬期间,‘华油杂62’和‘华油杂9号’的叶片SOD活性变化波动并不大,但仍可以看出日最低温降至3和0℃时SOD活性发生上升变化。

### 6.2 过氧化物酶(POD)活性变化

2012~2013年度,当日最低温降至5、3℃时,叶片POD活性有上升反应(图7)。在3℃以下时,不同品种变化范围在3 323.03~5 160.52 U·g<sup>-1</sup>(FW)之间;此时抗寒性偏弱的‘中双11号’和‘华油杂9号’的POD活性显著高于‘华油杂62’和‘华双5号’(P<0.05),即抗寒性较强的品种POD活性反而较低。

2011~2012年度,在降温初期POD活性明显升高,且‘华油杂62’的POD活性高于‘华油杂9号’;但在随后的下降过程中,两品种差异不明显。

### 6.3 过氧化氢酶(CAT)活性变化

2012~2013年度,当日均温首次降至5℃以下时,CAT活性上升并达到最大值,不同品种变化范围在601.79~1 361.54 U·g<sup>-1</sup>(FW)之间,以‘华双5号’CAT活性显著高于其他几个品种(P<0.05)。此后CAT活性下降;但在低温胁迫最严重时,‘华油杂62’、‘华油杂9号’及‘华双5号’的CAT活性有上升过程,以‘华双5号’最高(图8)。与SOD、POD的变化相比较,似乎在环境温度刚开始下降产生胁迫作用时,CAT有短期强烈反应,持续低温胁迫后其活性下降,且不同品种反应的规律性不强。

2011~2012年度的CAT活性有类似变化规律,在初期低温骤降时CAT活性处于较高水平,随后下降。但‘华油杂62’的CAT活性明显高于‘华油杂9号’。

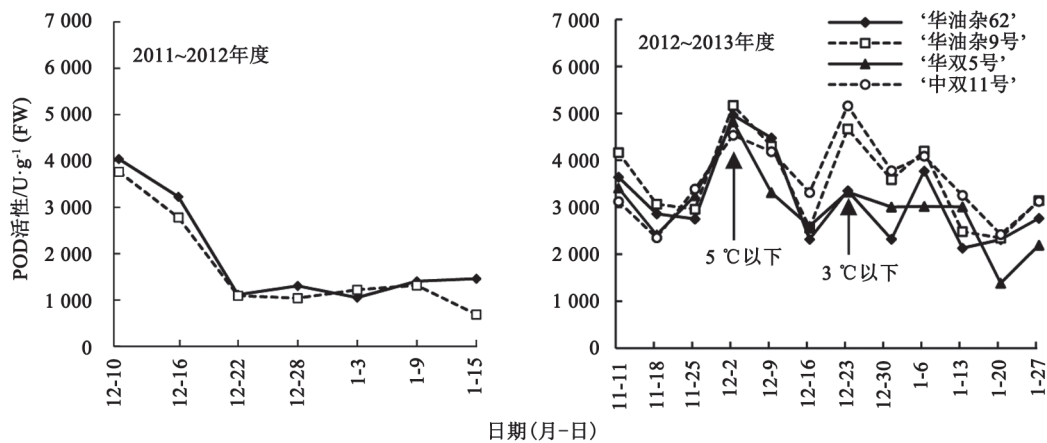


图7 油菜叶片POD活性变化

Fig.7 Changes of POD activity in the leaves of rapeseed

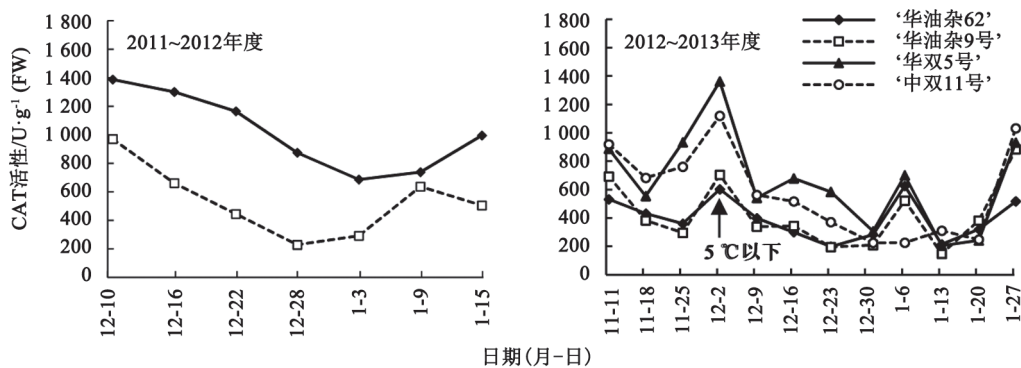


图8 油菜叶片CAT活性变化

Fig.8 Changes of CAT activity in the leaves of rapeseed



## 讨 论

### 1 油菜低温伤害与农艺性状、生理指标变化的关系

长江流域低温发生时期常年在12月至1月,对正常播种的油菜来说,此时多处于花芽分化或现蕾抽薹前后。如此阶段油菜营养生长足够,日均气温在5℃以上,不同油菜主茎或迟或早开始有所伸长,绿叶数继续增加。本研究的系统观察表明,在日均温度低于5℃时,油菜生长速度变得缓慢;日均温低于3℃时,油菜生长则趋于停滞;当日均温低于-3℃,并持续3 d以上时,油菜幼苗就会出现凹凸不平的皱缩或冻伤斑块。如表4所示,在日均温低于3℃期间,4个品种在19 d内的株高及绿叶数增长都很小,但‘华双5号’的生长受到低温的影响是最小的。将4个品种低温期间的生长状态,与低温后的冻害指数(表3)相比较,可以看出,农艺性状与冻害发生程度的调查结果相吻合,均表明‘华双5号’抗寒性较强,‘华油杂62’其次,‘华油杂9号’和‘中双11号’抗寒性相对较弱。

对低温胁迫前后油菜功能叶生理指标的分析结果,同样支持了油菜在不同温度下的表型变化及冻害指数差异。当日均温降至5℃以下,多数生理指标出现升高或降低现象,至3℃以下开始表现一定的生理性伤害,0℃以下则伤害加重。但不同生理指标产生反应的低温范围不同,CAT、SOD活性分别在日均温降至5℃和3℃左右出现最大值,而脯氨酸和可溶性糖含量0℃时达到最大值。比较4个品种的测定数据,以脯氨酸含量、SOD和CAT活性等指标能相对稳定反应不同品种的抗寒性差异;在低温条件下,以抗寒性较强的‘华双5号’这3个指标均表现最高。

### 2 抗氧化酶的作用与低温下的反应差异

在逆境条件下,SOD、POD、CAT等三种酶相互协调配合,使体内自由基维持在正常的动态水平,从而有效地阻止细胞膜产生更大的伤害(Bowler等1992;简令成1992;Prasad 1997;Gechev等2003)。研究也表明,短期的低温胁迫会使植物体内SOD、POD、CAT等酶活性升高,有利于植株在低温胁迫时维持一定的抗寒力,但随着胁迫程度的增强,破坏了活性氧产生与清除的平衡关系,细胞膜系统破坏,则导致植株SOD、POD、CAT活性显著降低(Baek和Skinner 2003;张俊杰等2011)。

本试验结果表明,油菜叶片的SOD活性在温度降至10℃左右时就开始有一定升高反应,似乎是对温度下降反应最早的。3~5℃低温下叶片SOD、POD、CAT活性大幅度增加,明显高于低温前水平,说明油菜在3~5℃低温胁迫下产生了一定的抗性,但随着低温降至3℃及0℃以下并持续加重冻害,CAT和SOD分别降至较低水平,说明细胞膜系统可能遭到一定程度的破坏或出现酶失活反应。同时这3种酶对低温胁迫的反应过程及失活的低温下限是有差异的。比较来看,CAT在日均温降至5℃时活性最高,SOD在3℃时活性最高,POD在5、3、0℃以下时都有升高反应,可能耐受低温的能力更强一些。三种酶与低温伤害之间的关系以及三者之间如何相互配合产生抗寒作用的执行机制尚有待进一步研究。

对不同抗寒性油菜研究发现(Zou等2007;朱惠霞等2007),在短期低温胁迫下,POD活性上升,且抗寒性强品种的POD活性高。但本研究发现在持续0℃以下低温时,抗寒性较强品种的POD活性反而较低,与前人的研究结果不太一致。这种不一致可能与本试验的0℃以下低温持续时间较长有关;由于不抗寒品种的SOD活性相对较低,在持续低温下累积了较多的过氧化物,使得POD活性在0℃以下反而上升更多。对草坪草的研究也发现低温胁迫较重或胁迫时间较长时,抗寒品种的POD活性低于抗寒性较弱的品种(张强等2004)。同时由于受到SOD等酶活性的交叉影响,POD对低温的反应表现出了相对滞后的现象。

### 3 油菜生长发育进程与可溶性物质的阶段性变化

本研究与前人研究均证明,低温逆境下的植物体内SS以及与之共存的可溶性物质脯氨酸、SP含量增加与植物的抗寒性密切相关(李春燕等2011;宋广树等2011;Koehler等2012)。但本研究结果还显示,在低温胁迫期结束后,不同品种的MDA含量和SOD、POD活性等指标回复至降温前水平,而脯氨酸、SS和SP等可溶性物质在低温结束后仍有升高趋势或保持较高水平,其中‘华双5号’的可溶性蛋白含量甚至高于低温前水平,这种现象可能与不同品种在1月下旬逐渐进入抽薹期,其生育时期发生阶段性转变有关。

前人研究发现油菜叶片在不同发育时期有黑黄颜色变化(碳氮消长变化),一般在抽薹开花前SS

升高叶色转黄(碳代谢增强,糖含量升高),标志着生长中心已转向生殖器官(傅寿仲等1983)。本试验的田间调查表明,4个品种先后在2月上旬进入蕾薹期,在1月13日至27日环境温度升至5℃以后,叶片SS仍保持较高水平,可能是油菜进入抽薹前碳代谢增强的表现。即在温度过高或过低条件下,SS含量升高是植株对逆境反应;但在环境适宜条件下叶片SS含量出现升高则可能是阶段性生长的启动信号。

相关研究也表明,脯氨酸含量不仅与植物的抗寒性密切相关,也随植株的生长发育发生消长变化。如菊花(田彦彦等2009)、马铃薯(抗艳红等2011)的脯氨酸含量均在进入花期后明显升高。油菜生长发育过程中脯氨酸含量是否也存在这样的规律,如何正确分析脯氨酸变化与植株对不同低温条件反应的关系尚有待进一步研究。

两个年度大田栽培条件下研究冬季低温对油菜的影响,结果表明日均温降至5℃以下,多数生理指标出现升高或降低现象,至3℃以下开始表现一定的生理性伤害,0℃以下则伤害加重。不同生理指标比较,以功能叶可溶性糖含量随环境温度下降而迅速升高的反应最明显;以脯氨酸含量、SOD和CAT酶活性等指标能相对稳定反应不同品种的抗寒性差异。

### 参考文献

- 傅寿仲,贺观钦,朱耕如,王祖福(1983). 油菜的形态与生理. 南京:江苏科学技术出版社, 89~95
- 简令成(1992). 植物抗寒机理研究的新进展. 植物学通报, 9 (3): 17~22
- 康冬鸽,李瑞梅,胡新文,郭建春(2009). 低温胁迫下木薯几种保护酶活性变化及其与耐寒性的关系. 热带作物学报, 30 (7): 908~911
- 抗艳红,龚学臣,赵海超,张丽萍,张文聘,田再民,乔海明(2011). 不同生育时期干旱胁迫对马铃薯生理生化指标的影响. 中国农学通报, 27 (15): 97~101
- 李春燕,陈思思,徐雯,李东升,顾骁,朱新开,郭文善,封超年(2011). 苗期低温胁迫对扬麦16叶片抗氧化酶和渗透调节物质的影响. 作物学报, 37 (12): 2293~2298
- 李合生(2000). 植物生理生化试验原理和技术. 北京:高等教育出版社
- 刘后利(1985). 油菜的遗传育种. 上海:上海科学技术出版社
- 刘艳阳,李俊周,陈磊,崔党群(2006). 低温胁迫对小麦叶片细胞膜脂质过氧化产物及相关酶活性的影响. 麦类作物学报, 26 (4): 70~73
- 宋广树,孙忠富,孙蕾,杜克明,王夏(2011). 东北中部地区水稻不同生育时期低温处理下生理变化及耐冷性比较. 生态学报, 31 (13): 3788~3795
- 田彦彦,王领,王林忠,李永华,杨秋生(2009). 不同生育期菊花叶片生理指标的比较研究. 河南科学, 27 (2): 172~174
- 王萍,张成军,陈国祥,王静,施大伟,吕川根(2006). 低温对水稻剑叶膜脂过氧化和脂肪酸组分的影响. 作物学报, 32 (4): 568~572
- 王瑞,马凤鸣,李彩凤,陈胜勇,侯静(2008). 低温胁迫对玉米幼苗脯氨酸、丙二醛含量及电导率的影响. 东北农业大学学报, 39 (5): 20~23
- 杨宁宁,孙万仓,刘自刚,史鹏辉,方彦,武军艳,曾秀存,孔德晶,鲁美宏,王月(2014). 北方冬油菜抗寒性的形态与生理机制. 中国农业科学, 47 (3): 452~461
- 张俊杰,孙万仓,李学才,方彦,张朋飞,姜海杨,陈娇荣(2011). 北方旱寒区冬油菜适宜群体的生长发育特性及生理生化基础. 西北农业学报, 20 (8): 82~88
- 张强,李建龙,晏笏,刘自学,陈光耀(2004). 温度胁迫对亚热带常用草坪草活性氧代谢相关酶的影响. 草业科学, 21 (10): 83~86
- 朱惠霞,孙万仓,邓斌,燕妮,武军艳,范惠玲,叶剑,曾军,刘雅丽,张亚宏(2007). 白菜型冬油菜品种的抗寒性及其生理生化特性. 西北农业学报, 16 (4): 34~38
- Baek KH, Skinner DZ (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci*, 165 (6): 1221~1227
- Bergmeyer HU (1965). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London: Elsevier
- Bhatnagar-Mathur P, Devi MJ, Vadez V, Sharma KK (2009). Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress. *J Plant Physiol*, 166 (11): 1207~1217
- Bowler C, Montagu MV, Inze D (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43 (1): 83~116
- Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG (1997). Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (relationships to resistance). *Plant Physiol*, 113 (1): 249~257
- Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toncheva V, Minkov I (2003). Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol*, 160 (5): 509~515
- Koehler G, Wilson RC, Goodpaster JV, Sonstebly A, Lai X, Witzmann FA, Alsheikh M (2012). Proteomic study of low-temperature responses in strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa*) that differ in cold tolerance. *Plant Physiol*, 159 (4): 1787~1805
- Luo XL, Huang QF (2012). Studies on the cold resistance of cassava. *J Agric Sci*, 4 (6): 104~119
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, Botterman J (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*, 103 (4): 1155~1163
- Prasad TK (1997). Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol*, 114 (4): 1369~1376
- Raza SH, Athar HR, Ashraf M, Hameed A (2007). Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot*, 60 (3): 368~376
- Zou WH, Chen YZ, Lu CF (2007). Differences in biochemical responses to cold stress in two contrasting varieties of rape seed (*Brassica napus* L.). *For Stud China*, 9 (2): 142~146