

文章编号:1000-8551(2020)03-0669-11

青梗不结球白菜耐热性的抗氧化指标评估体系建立

邹凯茜¹ 杨 衍² 田丽波^{1,*} 商 桑¹ 曾丽萍¹郭雪松¹ 刘子记² 朱国鹏¹

(¹ 海南大学园艺学院/海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南海口 570228; ² 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南 儋州 571737)

摘要:为发掘耐热性不结球白菜种质资源并为生产推荐耐热性优良品种,本试验采用多元统计的方法对高温胁迫处理的19个青梗不结球白菜品种的幼苗抗氧化相关指标进行综合分析。结果表明,高温胁迫5 d后,不同品种各指标的平均变异系数为33.26%,品种间除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)产生速率差异显著,其他指标均差异极显著。各指标相关性达显著、极显著的有6个,其中 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率与过氧化氢(H_2O_2)含量呈极显著正相关。将13个指标降维成5个主成分,解释了74.5%的差异来源。根据主成分得分计算隶属函数获得综合指标 D 值,对供试材料进行排序,筛选出耐热性前三位的品种分别为青16、青20、青2,后三位品种为青1、青8、青15。并根据 D 值将19种青梗不结球白菜聚为三类,聚类结果综合评价中APX、AsA、MDA、POD耐热系数和HII均与耐热性成反比,将各指标进行多元回归分析,获得精度高的综合评价模型 $D=0.752\ 75-0.021\ 90APX-0.042\ 48MDA-0.034\ 08AsA-0.079\ 84POD-0.225\ 61HII$,可作为青梗不结球白菜耐热性综合评价模型。本研究结果为不结球白菜耐热性和品种选育的科学准确的评价体系的建立提供了一定的理论基础。

关键词:不结球白菜;青梗;主成分分析;隶属函数;耐热性

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.03.0669

不结球白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino.) 又称小白菜、青菜、油菜,属十字花科芸薹属,原产于我国长江中下游地区,品种资源丰富^[1]。青梗不结球白菜是一种速生蔬菜,复种指数大,一年四季均可种植,非常适于保护地周年生产,在全国各地均有栽培,其种植面积约占蔬菜种植总面积的30%,主要集中在长江流域及其以南地区。青梗不结球白菜以其清爽的口感和丰富的营养价值,深受广大消费者青睐^[2-4]。在海南等华南地区,人们在炎热季节更喜食绿叶蔬菜,但夏秋高温往往是叶用蔬菜生产的制约性因素,本地生产绿叶蔬菜不能满足市场需求,常采取异地供应措施,大幅度提升了蔬菜成本,导致菜价高昂。热胁迫也已成为限制全球蔬菜产量的一个重要因素^[5-6],因此,研究不结球白菜耐热机制,选育耐热性强的不结球白菜对于解决高温季节蔬菜供应问题具有

现实意义。

耐热相关生理研究中,对抗氧化物质有大量报道,胡俏强^[7]和陈以博等^[8]从生理生化角度对不同耐热性的不结球白菜进行了耐热性鉴定,发现超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(polyphenol oxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量与电导率可作为耐热鉴定指标。Fujita等^[9]发现甘蓝的POD在38℃热激下仍能保持较高活性;吴国胜等^[10]对大白菜的研究表明,高温导致其POD活性降低,CAT活性升高,耐热性强的品种POD活性高于耐热性弱的品种,且SOD活性在高温下也较为稳定;叶陈亮等^[11]在大白菜耐热研究中提出,耐热品种的SOD、CAT和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性上升,热敏品种SOD和APX活性均下降。由此可见,抗氧化物质在植物与

收稿日期:2018-09-12 接受日期:2018-12-04

基金项目:2017年海南省重大科技计划项目(ZDKJ2017001),农业农村部财政专项项目(NFZX2018),2018年海南省研究生创新科研课题(Hys2018-34)

作者简介:邹凯茜,女,主要从事园艺植物抗逆性研究。E-mail:1046615125@qq.com

* 通讯作者:田丽波,女,副教授,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:faiy7play@163.com

热胁迫之间扮演着重要角色。

植物对高温的响应是敏感复杂的,涉及基因型、发育阶段、生理生化、外部环境等多个层次,选择合适的耐热品种的筛选与鉴定方法能极大提高筛选效率。多元统计法目前已广泛应用于黑麦草^[12]、葡萄砧木^[13]、辣椒^[14]和偃麦草^[15]等植物的抗逆性综合评价,而对于青梗不结球白菜的评价鲜见报道。利用主成分分析并结合隶属函数、计算综合评价 *D* 值的方法能够对众多指标进行降维,减少后期聚类的计算量,避免主观决断。本研究在前人研究的基础上,采用多元统计方法对高温胁迫下 19 个青梗不结球白菜品种幼苗的抗氧

化相关指标进行综合分析,客观全面地评价各品种幼苗的耐热性,筛选出耐热性相对优良的青梗不结球白菜品种,并基于各指标与耐热性之间的关系建立不结球白菜耐热性评价的数学模型,以期不为结球白菜耐热性资源发掘和品种选育提供科学准确的评价体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验所用 19 份青梗不结球白菜种子资源详见表 1。

表 1 供试种子
Table 1 Seeds used in this study

序号 No.	代号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Source
1	青 1	奥星(青江白)	青梗	丰顺利农(北京)种子有限责任公司
2	青 2	美都(初绿 2 号)	青梗	上海菲托种子有限公司
3	青 5	上海夏冬青	青梗	桂林市桂华种子有限公司
4	青 6	原种上海青	青梗	星原种苗经营部
5	青 8	大头上海青(鑫达)	青梗	桂林市庆丰种子有限公司
6	青 12	德高 206	青梗	德高蔬菜种苗研究所
7	青 14	上海青(鸡毛菜)	青梗	江苏省江蔬种苗科技有限公司
8	青 15	香港甜脆青梗菜	青梗	珠海市斗门区井岸兴隆蔬菜种籽店
9	青 16	华良华新青梗菜	青梗	山东华良种业有限公司
10	青 17	福京小白菜	青梗	香港田友农业联合公司
11	青 18	汉绅一号青梗菜	青梗	武汉汉研种苗科技有限公司
12	青 19	四季大头清江白菜(328)	青梗	梅州市吉丰种业发展有限公司
13	青 20	杰冠青梗菜	青梗	广州市越秀区张水江菜种店
14	青 21	华夏王瓢菜	青梗	德高蔬菜种苗研究所
15	青 24	广研清江白菜	青梗	湛江市新苗种子有限公司
16	青 26	原种繁育上海青	青梗	江西省赣新种子有限公司
17	青 28	夏帅青梗菜	青梗	青岛南北种业有限公司
18	青 29	绿亨美帝	青梗	绿亨科技股份有限公司
19	青 30	广研新选清江白菜	青梗	广州市越秀区绿河种子经营部

1.2 试验方法

选取上述 19 份青梗不结球白菜品种的种子各 140 粒,55℃温汤浸种,适温催芽,60%露白时播种于基质体积比为泥炭:蛭石:珍珠岩=1:1:1的 50 孔(1 粒/孔)育苗穴盘,常规管理。当幼苗长至 4~5 片真叶时,选取长势一致的幼苗置于人工气候箱均先按表 2

预处理方式进行处理,再分为两组,分别进行对照处理和正式处理,每处理 3 次重复,每个重复 18 株,按完全随机区组排列。处理完成后,每个重复随机选取 10 株,根据全株叶片反卷及褪绿情况调查热害等级;每个重复随机选取植株第 2 和第 3 片真叶剪碎并混匀称取目标质量,最后进行各项指标的测定。

表 2 试验处理条件
Table 2 Conditions of experimental processing

处理 Treatments	处理时间 Treatment time/d	昼夜温度 Temperature of day and night	光照强度 Light intensity /($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	光周期 Photoperiod /(昼/夜)	湿度 Humidity/%
预处理 Pretreatment	2	25℃/18℃	300	12 h/12 h	70~80
正式处理 Treatment	5	37℃/27℃	300	12 h/12 h	70~80
对照 Control	5	25℃/18℃	300	12 h/12 h	70~80

1.3 测定项目及方法

热害指数(heating-injury index, HII)的测定参考刘维信等^[16]和胡俏强等^[17]的方法。每天对植株进行观察,根据叶片反卷及褪绿,统计叶片受害数量,再进行分级:0级:无热害症状,植株正常;1级:植株受害叶片数<全株叶片数的1/3;3级:全株叶片数的1/3≤植株受害叶片数<全株叶片数的1/2;5级:全株叶片数的1/2≤植株受害叶片数<全株叶片数的2/3;7级:植株受害叶片数≥全株叶片数的2/3或植株失去经济价值。按照公式计算热害指数:

热害指数 = Σ (各级株数×级数) / (最高级数×调查总株数) × 100% (1)。

根据热害指数,将19个不结球白菜品种按照耐热性进行分类:≥91%为极弱,81%≤极弱至弱<91%,69%≤弱<81%,57%≤弱至中<69%,45%≤中<57%,33%≤中至强<45%,21%≤强<33%,11%≤强至极强<21%,0≤极强<11%。

MDA含量测定采用硫代巴比妥酸显色法;抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)含量测定采用二氯靛酚滴定法;POD活性测定采用愈创木酚法;CAT活性测定采用紫外比色法;苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性测定参考李合生^[18]的生理生化试验指导方法;多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性测定参考朱广廉等^[19]的植物生理学试验方法;SOD活性测定采用氮蓝四唑显色法;APX活性、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性测定及此3种酶粗提液的制备,过氧化氢含量测定(H₂O₂),谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量测定均参考吴华^[20]的方法;超氧阴离子自由基(O₂⁻)产生速率测定采用李忠光等^[21]的改进羟胺法。

1.4 数据处理

将原始数据录入Microsoft Office Excel 2010,按公照式(2)计算各指标耐热系数(热害指数除外),运用

SAS 9.4 软件对各品种各指标的耐热系数及热害指数进行ANOVA方差分析、相关分析、回归分析、主成分分析,利用公式(3)、(4)计算隶属函数值(U),公式(5)计算权重(W_i),按照公式(6)计算综合指标值D,并进行聚类分析,从而评价各品种的耐热性。

耐热系数 = 处理值 / 对照值 (2)。

隶属函数与耐热性呈正相关时,按照公式(3)计算;呈负相关时按照公式(4)计算:

$U(X_i) = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \times 100\%$ (3)

$U(X_i) = [1 - (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})] \times 100\%$ (4)

式中,X_i:第*i*个综合指标值;X_{min}:第*i*个综合指标的最小值;X_{max}:第*i*个综合指标的最大值。

$W_i = P_i / \sum P_i$ (5)

式中,P_i:第*i*个综合指标的贡献率。

$D = \sum U(x_i) \times W_i$ (6)。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫下不结球白菜各指标耐热系数的方差分析及相关分析

由表3可知,不同品种的各指标耐热系数均不同程度的偏离1,说明不同品种对于热胁迫的响应存在较大的差异。根据各性状的平均值,37℃/27℃高温处理5 d后,19个品种GSH、H₂O₂含量和O₂⁻产生速率的耐热系数的平均值均小于1,说明高温胁迫下这些指标都较正常生长的对照组有所降低,而APX、GR、SOD、POD、CAT、PPO、PAL活性和MDA、AsA含量则较对照组高。

研究青梗不结球白菜品种的性状多样性发现,13个性状的平均变异系数为33.26%,其中APX活性变异系数最大,为65.558%,GR活性次之,PAL活性的

变异系数最小,为 13.214%。对各指标耐热系数进行单因素 ANOVA 分析发现,除 O₂⁻ 产生速率在 19 种青梗不结球白菜之间存在显著差异 ($P<0.05$),APX、GSH、GR、SOD、POD、CAT、PPO、PAL 活性,MDA、AsA、

H₂O₂ 含量以及 HII 均在不同品种之间存在极显著差异 ($P<0.01$),说明不同的青梗不结球白菜品种在耐热性上具有很好的遗传多样性,这 13 个指标都可以作为青梗不结球白菜耐热性的鉴定指标。

表 3 19 种青梗不结球白菜耐热系数及品种间变异分析
Table 3 Heat tolerance coefficient and variation among 19 varieties of green stalks non-heading Chinese cabbage

代号 Code	耐热系数 Heat-tolerance coefficient												热害指 数 HII
	抗坏血 酸过氧化 酶活性 Activity of APX	谷胱甘 肽含量 Content of GSH	谷胱甘 肽还原 酶活性 Activity of GR	丙二醛 含量 Content of MDA	抗坏血 酸含量 Content of AsA	过氧化 氢含量 Content of H ₂ O ₂	超氧阴离 子自由基 产生速率 O ₂ ⁻ production rate	超氧化 物歧化 酶活性 Activity of SOD	过氧化 物酶活 性 Activity of POD	过氧化 氢酶活 性 Activity of CAT	多酚氧 化酶活 性 Activity of PPO	苯丙氨 酸解氨 酶活性 Activity of PAL /%	
青 1	0.550	0.907	2.000	2.439	0.536	0.659	1.187	1.469	2.582	0.286	1.100	1.861	65.3
青 2	0.889	0.920	0.750	1.045	0.881	0.718	1.033	0.927	0.574	0.600	2.333	1.182	48.6
青 5	0.947	0.971	0.889	1.299	1.600	0.663	0.987	0.502	2.492	2.200	1.197	1.888	80.1
青 6	3.333	1.090	0.469	1.029	0.667	1.190	0.957	1.093	1.594	0.643	1.059	1.298	38.2
青 8	2.500	0.941	0.556	2.474	1.900	0.572	0.850	0.927	2.164	3.444	0.286	1.793	59.6
青 12	0.556	1.632	2.400	1.871	1.429	0.534	0.946	1.284	1.504	1.167	1.345	1.901	47.1
青 14	0.636	0.818	0.846	2.336	3.667	0.978	0.843	0.818	1.666	0.974	4.533	1.176	45.7
青 15	0.842	0.798	1.625	2.859	2.143	0.636	0.843	1.166	1.292	1.889	1.090	1.309	75.0
青 16	1.032	1.070	0.750	1.008	0.700	0.676	1.112	0.645	0.630	1.000	0.639	1.196	13.4
青 17	0.750	0.786	1.247	1.107	1.222	1.921	1.349	0.293	0.424	1.182	0.753	1.028	61.6
青 18	0.900	0.154	1.263	1.054	1.273	0.692	1.029	0.964	0.855	0.643	1.022	1.125	31.8
青 19	1.167	1.159	0.750	1.704	1.750	1.566	1.024	0.667	0.974	0.258	0.500	2.361	63.9
青 20	1.750	0.782	0.778	1.628	0.797	0.662	0.571	0.698	0.932	0.469	0.608	1.331	20.5
青 21	0.091	1.351	0.778	1.056	1.088	1.196	1.094	0.900	1.247	3.056	1.040	2.153	24.0
青 24	3.333	0.814	0.438	2.486	0.300	0.602	0.639	1.722	1.692	0.431	2.444	1.608	41.8
青 26	1.500	0.958	0.167	2.612	0.135	1.276	1.206	1.084	1.406	1.750	1.424	2.228	50.0
青 28	1.400	1.377	1.600	1.303	1.000	0.461	0.796	1.232	1.866	1.333	1.850	4.418	31.2
青 29	0.273	0.938	1.100	1.190	0.882	1.178	1.187	0.810	1.543	1.250	0.388	1.403	31.1
青 30	0.375	0.782	1.200	1.663	1.917	0.654	0.956	2.064	1.544	0.667	1.130	1.038	60.9
均值 Mean	1.201	0.960	1.032	1.693	1.257	0.886	0.979	1.014	1.420	1.223	1.302	1.700	46.8
F 值 F value	8.35**	6.25**	2.85**	5.96**	11.7**	6.12**	2.15*	3.46**	16.3**	6.8**	46.9**	41.4**	19.6**
变异系数 CV/%	65.558	19.852	55.234	42.107	32.937	32.133	26.002	42.211	20.046	48.574	18.948	13.214	15.573

注: * 表示在 0.05 水平上显著相关; ** 表示在 0.01 水平上显著相关。下同。
Note: * indicates significant correlation at 0.05 level. ** indicates significant correlation at 0.01 level. The same as following.

2.2 青梗不结球白菜各指标相关分析

对 19 种青梗不结球白菜的 13 个指标进行相关分析(表 4),结果表明,各指标之间存在一定的正负相关

关系。其中,APX 活性耐热系数与 GR 活性、O₂⁻ 生成速率的耐热系数之间的相关系数分别为 -0.518、-0.502,H₂O₂ 含量与 SOD 活性耐热系数相关系数为

-0.498,均表现为显著负相关;PAL 活性与 GSH 含量、HII 与 MDA 含量的耐热系数之间的相关系数分别为 0.562、0.462,均为显著正相关,H₂O₂ 含量与 O₂⁻产生速率的耐热系数之间表现为极显著正相关,相关系数为 0.604。由此可知,青梗不结球白菜抵抗热胁迫的反应是一个综合反应,单一指标不能准确解释各品种间的耐热能力,需要利用多元统计的方法评价不同品种的耐热性。

表 4 青梗不结球白菜 13 个指标耐热系数的相关分析

Table 4 The correlation analysis of 13 indicators about heat-tolerance of non-heading Chinese cabbage

指标 Index	抗坏血 酸过氧 化酶 活性 Activity of APX	谷胱甘 肽含量 Content of GSH	谷胱甘 肽还原 酶活性 Activity of GR	丙二醛 含量 Content of MDA	抗坏血 酸含量 Content of AsA	过氧化 氢含量 Content of H ₂ O ₂	超氧阴 离子自 由基产 生速率 O ₂ ⁻ production rate	超氧化 物歧化 酶活性 Activity of SOD	过氧化 物酶 活性 Activity of POD	过氧化 氢酶 活性 Activity of CAT	多酚氧 化酶 活性 Activity of PPO	苯丙氨 酸解氨 酶活性 Activity of PAL	热害 指数 HII
抗坏血酸过氧化酶活性 Activity of APX	1												
谷胱甘肽含量 Content of GSH	-0.058	1											
谷胱甘肽还原酶活性 Activity of GR	-0.518 *	0.219	1										
丙二醛含量 Content of MDA	0.197	-0.067	0.053	1									
抗坏血酸含量 Content of AsA	-0.317	-0.097	0.165	0.223	1								
过氧化氢含量 Content of H ₂ O ₂	-0.113	0.000 4	-0.303	-0.232	-0.026	1							
超氧阴离子自由基产生 速率 O ₂ ⁻ production rate	-0.502 *	0.014	0.094	-0.309	-0.198	0.604 **	1						
超氧化物歧化酶活性 Activity of SOD	0.149	0.018	0.229	0.405	-0.111	-0.498 *	-0.308	1					
过氧化物酶活性 Activity of POD	0.154	0.190	0.172	0.436	0.101	-0.413	-0.193	0.373	1				
过氧化氢酶活性 Activity of CAT	-0.074	0.250	-0.147	0.123	0.187	-0.036	0.076	-0.229	0.274	1			
多酚氧化酶活性 Activity of PPO	0.011	-0.041	-0.062	0.252	0.424	-0.159	-0.292	0.190	0.113	-0.202	1		
苯丙氨酸解氨酶活性 Activity of PAL	0.056	0.562 *	0.160	0.037	-0.171	-0.148	-0.139	0.092	0.356	0.207	0.009	1	
热害指数 HII	-0.091	-0.090	0.202	0.462 *	0.352	0.085	0.151	0.090	0.397	0.130	0.002	-0.061	1

2.3 青梗不结球白菜各指标主成分分析

将各品种各指标数据进行主成分分析,对 13 个指标进行降维处理,根据特征值大于 1 的原则,得表 5 中 5 个主成分,对应 5 个综合指标,其对应的贡献率分别为 22.6%、15.6%、14.7%、11.8%、9.7%,累计贡献率为 74.5%,解释了全部 74.5%的差异来源。各主成分中取绝对值大于 0.35 的特征向量为主要特征向量,因此决定综合指标 1 的主要有 MDA (0.399)、H₂O₂

(-0.416)、O₂⁻(-0.378)、SOD(0.388)、POD(0.424),决定综合指标 2 的主要有 APX (-0.513)、GR (0.412)、O₂⁻(0.357)、HII (0.377),决定综合指标 3 的主要包括 GSH (0.512)、AsA (-0.424)、PAL (0.525),综合指标 4 主要由 GR (-0.525)、CAT (0.510)决定,综合指标 5 主要由 AsA(-0.474)、PPO (-0.491)、HII(0.350)决定。

表 5 青梗不结球白菜指标主成分分析

Table 5 Principal component analysis of the index of non-heading Chinese Cabbage

项目 Item	主成分 1 PC1	主成分 2 PC2	主成分 3 PC3	主成分 4 PC4	主成分 5 PC5
特征值 Eigenvalues	2. 936	2. 047	1. 910	1. 528	1. 256
贡献率 Contributive ratio/%	22. 6	15. 6	14. 7	11. 8	9. 7
累计贡献率 Cumulative contributive ratio/%	22. 6	38. 3	53. 0	64. 8	74. 5
特征向量 Feature vector					
抗坏血酸过氧化酶活性 Activity of APX	0. 159	-0. 513	0. 106	0. 347	0. 131
谷胱甘肽含量 Content of GSH	0. 081	0. 223	0. 512	0. 001	-0. 244
谷胱甘肽还原酶活性 Activity of GR	0. 144	0. 412	0. 049	-0. 525	0. 102
丙二醛含量 Content of MDA	0. 399	0. 059	-0. 209	0. 239	0. 200
抗坏血酸含量 Content of AsA	0. 142	0. 296	-0. 424	0. 085	-0. 474
过氧化氢含量 Content of H ₂ O ₂	-0. 416	0. 118	-0. 082	0. 273	0. 048
超氧阴离子自由基产生速率 O ₂ ⁻ production rate	-0. 378	0. 357	0. 018	0. 007	0. 302
超氧化物歧化酶活性 Activity of SOD	0. 388	-0. 113	0. 006	-0. 291	0. 316
过氧化物酶活性 Activity of POD	0. 424	0. 183	0. 130	0. 195	0. 173
过氧化氢酶活性 Activity of CAT	0. 048	0. 272	0. 197	0. 510	-0. 174
多酚氧化酶活性 Activity of PPO	0. 227	-0. 073	-0. 294	-0. 092	-0. 491
苯丙氨酸解氨酶活性 Activity of PAL	0. 191	0. 128	0. 525	0. 038	-0. 175
热害指数 HII	0. 179	0. 377	-0. 276	0. 269	0. 350

2.4 青梗不结球白菜综合指标隶属函数分析

将原始数据标准化后与特征向量值计算 5 个综合指标得分值(表 6),综合指标值越大耐热性越强。根据各综合指标主要特征向量指标的正负相关性选择隶属函数的计算公式,计算各品种的综合指标隶属函数值,并得到其平均值,计算综合指标 D 值。耐热性与 D 值呈正相关关系,根据 D 值大小,对各品种耐热性进行排序,耐热性前五的品种分别是青 16、青 20、青 2、青 18、青 21,耐热性弱的 5 个品种分别是青 15、青 8、青 1、青 5、青 14)(表 7)。

2.5 青梗不结球白菜耐热回归模型建立

将各品种所有指标耐热系数及热害指数(自变

量)与 D 值(因变量)进行多元线性逐步回归分析,所有变量显著($P<0.15$)进入方程的有 APX、MDA、AsA、POD、HII,共 5 个指标,最终获得如下最优方程:

$$D=0.752\ 75-0.021\ 90x_1-0.042\ 48x_4-0.034\ 08x_5-0.079\ 84x_9-0.225\ 61x_{13}$$

其中, x_1 :APX; x_4 :MDA; x_5 :AsA; x_9 :POD; x_{13} :HII。
 $R^2=0.908\ 3$,信息量(Cp)=2.182 6

通过回归方程预测 D 值并检验其精度,精度范围为 77.5%~99.4%,其平均精度为 93.2%,说明其预测精度高,可靠性强。

表 6 青梗不结球白菜耐热系数主成分得分值

Table 6 Principal component scores of heat-tolerant coefficient of non-heading Chinese Cabbage

品种 Cultivars	主成分 1 PC1	主成分 2 PC2	主成分 3 PC3	主成分 4 PC4	主成分 5 PC5
青 1	1.646	1.506	0.069	-1.273	2.343
青 2	-1.105	-0.762	-0.686	-0.910	-0.537
青 5	0.632	1.547	0.076	1.527	-0.039
青 6	0.711	0.711	0.711	0.711	0.711
青 8	1.739	0.172	0.361	2.909	0.187
青 12	1.359	1.735	1.228	-1.855	-0.344
青 14	1.400	0.489	-3.132	0.240	-2.967
青 15	1.661	1.262	-1.560	0.299	0.461
青 16	-2.132	-1.037	0.841	-0.823	-0.510
青 17	-3.750	1.304	-1.036	0.519	0.538
青 18	-1.314	-0.986	-1.460	-1.394	0.394
青 19	-1.273	0.602	0.029	0.676	0.026
青 20	-0.292	-2.440	0.084	-0.501	-0.527
青 21	-1.416	1.055	1.835	0.574	-1.287
青 24	2.443	-3.249	-0.223	0.296	0.666
青 26	-0.377	-0.317	0.571	1.726	1.053
青 28	1.964	0.220	3.123	-1.015	-1.416
青 29	-1.767	0.629	0.518	-0.385	0.429
青 30	1.194	0.352	-1.352	-1.379	1.028

2.6 青梗不结球白菜聚类分析

根据表 7 中 D 值可以判断耐热性较强的品种有青 16、青 20、青 2，耐热性弱的是青 1、青 8、青 15。利用 SAS 9.4 软件,采用离差平方和法,依据 D 值对 19 份青梗不结球白菜进行聚类分析(图 1),在 $R^2=0.908$ 时,将其聚为 3 类。第一类为青 2、青 18、青 21、青 17、青 29、青 20、青 16,表现为强耐热;第二类为青 12、青 24、青 26、青 30、青 28、青 19,表现为中耐热;第三类为青 1、青 8、青 15、青 5、青 14、青 6,表现为热敏感。

2.7 综合评价

根据表 3 热害指数分级标准将青梗不结球白菜进行分类:青 5、青 15 为弱耐热;青 1、青 8、青 17、青 19 和青 30 划为弱至中;青 2、青 12、青 14、青 26,为中耐热;青 6、青 24 划为中至强;青 18、青 21、青 28、青 29 划为强耐热;青 16、青 20 划为强至极强。由图 1 可知,青 17 与青 19 属于强耐热类,与热害指数分析结果有一定程度的差异,由此可见单凭热害指数不能完全评价青梗不结球白菜的耐热性,存在一定的单一性,借助多元统计分析可以从多角度综合评价青梗不结球白菜的耐热性。将聚类分析结果对进入回归方程的指标进行归类计算其耐热系数平均值得表 8,结果发现 APX、MDA、HII、AsA、POD 随耐热性的增强其值越小。因此,在进行 37℃/27℃ 热胁迫 5 d 处理时,可将 APX、MDA、HII、AsA、POD 作为主要指标初步判别青梗不结球白菜的耐热性。

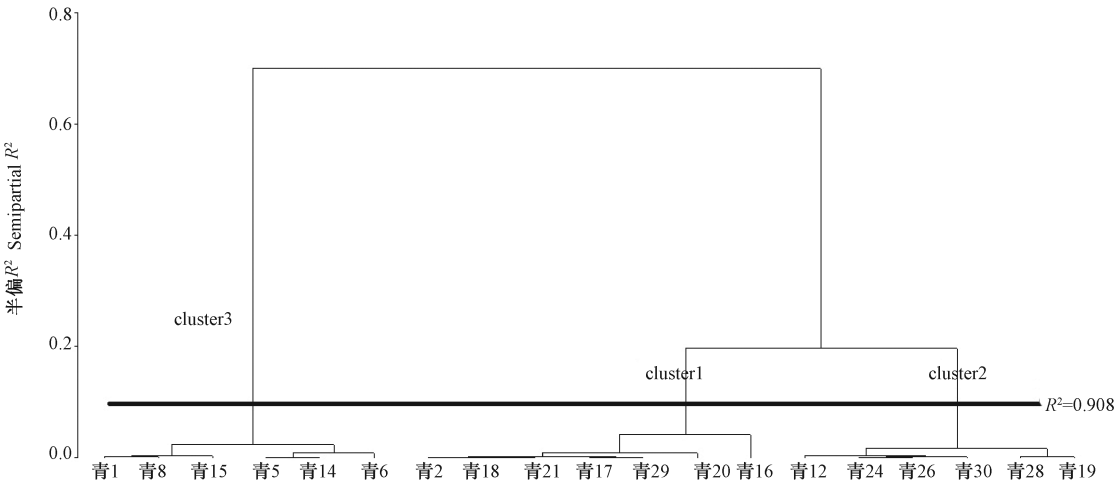


图 1 19 种青梗不结球白菜 D 值聚类结果

Fig.1 Clustering results of D value of 19 green stalked non-heading Chinese Cabbage

表 7 青梗不结球白菜隶属函数分析及综合评价

Table 7 Membership function analysis and comprehensive evaluation of non-heading Chinese Cabbage

品种 Cultivars	隶属函数值 Membership function value					平均值 Mean	D 值 D value	耐热性排序 Heat-resistance ranking
	$U(x_1)$	$U(x_2)$	$U(x_3)$	$U(x_4)$	$U(x_5)$			
青 1	0.129	0.046	0.512	0.878	0.000	0.313	0.249	17
青 2	0.573	0.501	0.391	0.802	0.542	0.562	0.498	3
青 5	0.292	0.038	0.513	0.290	0.449	0.316	0.268	16
青 6	0.280	0.205	0.614	0.461	0.307	0.374	0.321	14
青 8	0.114	0.314	0.558	0.000	0.406	0.278	0.232	18
青 12	0.175	0.000	0.697	1.000	0.506	0.476	0.355	13
青 14	0.168	0.250	0.000	0.560	1.000	0.396	0.276	15
青 15	0.126	0.095	0.251	0.548	0.354	0.275	0.207	19
青 16	0.739	0.556	0.635	0.783	0.537	0.650	0.597	1
青 17	1.000	0.086	0.335	0.502	0.340	0.453	0.478	6
青 18	0.607	0.546	0.267	0.903	0.367	0.538	0.491	4
青 19	0.600	0.227	0.505	0.469	0.436	0.448	0.418	9
青 20	0.442	0.838	0.514	0.716	0.540	0.610	0.532	2
青 21	0.623	0.136	0.794	0.490	0.684	0.545	0.485	5
青 24	0.000	1.000	0.465	0.549	0.316	0.466	0.376	11
青 26	0.455	0.412	0.592	0.248	0.243	0.390	0.376	12
青 28	0.077	0.304	1.000	0.824	0.708	0.583	0.433	8
青 29	0.680	0.222	0.584	0.691	0.360	0.507	0.476	7
青 30	0.202	0.722	0.285	0.900	0.248	0.471	0.392	10
权重 Weight	0.303	0.193	0.170	0.130	0.104			

表 8 各聚类的指标平均值

Table 8 Mean value of each cluster

类群 Cluster	耐热系数 Heat-tolerance coefficient				热害指数 HHI
	抗坏血酸过氧化物酶活性 Activity of APX	丙二醛含量 Content of MDA	抗坏血酸含量 Content of AsA	过氧化物酶活性 Activity of POD	
第一类 Cluster 1	0.932	1.172	0.959	0.826	0.345
第二类 Cluster2	1.388	1.94	1.088	1.498	0.492
第三类 Cluster3	1.468	2.073	1.752	1.965	0.606

3 讨论

目前对植物耐热性的研究已有很多报道。蔬菜植株受到高温胁迫时,体内会发生系列生理生化反应来适应高温胁迫,从而降低热害损伤,这是一个复杂的生

理过程。近年来,多元统计分析方法被大量应用在多指标综合评价的研究中,如黄瓜耐盐性^[22]、万寿菊属耐热与抗旱性^[23]、甜瓜幼苗耐冷性^[24]、苜蓿耐热性^[25]、荔枝耐贮藏性^[26]以及丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AM)对煤塌区土质的影响^[27]等,涉及了植物抗逆、果实品质以及微生物等多方面。

多元统计分析有利地提高了指标分析的准确性,其中主成分分析结合隶属函数的分析方法被大量运用。

本试验通过对 19 种来源不同的青梗不结球白菜施以 37℃/27℃ 持续 5 d 的高温胁迫,通过测定其抗氧化指标耐热系数发现,各品种除 O_2^- 产生速率差异显著,其他指标在品种之间均达极显著差异;变异系数在 13%~66% 之间,变异度很大,说明不同的青梗不结球白菜品种在耐热性上具有很好的遗传多样性,这 13 个指标都可以作为青梗不结球白菜耐热性评价鉴定的指标。此外,本研究还发现,各品种 GSH、 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率的耐热系数均值小于 1,说明处理 5 d 时,高温胁迫处理的青梗不结球白菜总体含量低于正常生长的植株,这与前人研究^[23,28-30] 存在一定偏差,可能由于部分青梗不结球白菜耐热性强,能快速应对热胁迫引起的活性氧增加,自身抗氧化酶活性大幅提高进而清除活性氧,并建立新的低水平活性氧平衡,使活性氧水平低于正常植株。

本研究相关性分析发现,各指标的耐热系数之间存在一定的正负相关性,MDA 含量的耐热系数与 HII 呈显著正相关,也验证了在热害胁迫处理下,热害现象越严重,细胞受损伤率越高,膜脂过氧化产物 MDA 含量越高,这与张娜^[31] 和付正来^[32] 的研究结果一致。 H_2O_2 与 O_2^- 作为活性氧物质,热害胁迫处理下其耐热系数呈极显著正相关,APX 活性与 O_2^- 产生速率、SOD 活性与 H_2O_2 含量的耐热系数之间均呈显著负相关。已知 SOD 与 APX 均为活性氧清除相关的物质,其在抗逆性中起重要作用,一定程度上与耐热性具有正相关^[33-35],其本研究中也存在一定相关性但并未达显著水平;本试验中 GR 活性与 APX 活性的热耐系数之间呈显著负相关,二者均能提高活性氧的清除能力,说明青梗不结球白菜受热害胁迫 5 d,二者活性没有同时升高,APX 活性在耐热性强品种中较耐热性弱品种低,与前人研究^[35] 存在差异,可能是热胁迫时间不同或者 APX 不是清除青梗不结球白菜活性氧的主要酶,具体原因还有待于进一步研究。

本研究聚类分析中,青 2、青 18、青 21、青 17、青 29、青 20 和青 16 表现为较强的耐热性;青 1、青 8、青 15、青 5、青 14、青 6 为热敏感型,该结果与热害指数结果不完全一致。由此可知,耐热性是一个综合性状,采用热害指数等单一指标不能准确评价青梗不结球白菜耐热性,这与周亚峰等^[24] 和韩瑞宏等^[25] 对种子资源的非生物胁迫评价结论一致。植物耐热机制复杂,不同品种之间存在性状差异,单一指标评价不能消除品种间的性状差异,会影响耐热性评价的准确性。

4 结论

本研究最终获得了耐热性强的品种青 16 与青 20,在聚类结果的综合评价中 APX、MDA、HII、AsA、POD 与耐热性成反比,也为后续筛选耐热品种提供了直接鉴定指标。本研究获得的耐热性综合评价模型 $D = 0.752\ 75 - 0.021\ 90APX - 0.042\ 48MDA - 0.034\ 08AsA - 0.079\ 84POD - 0.225\ 61HII$,其预测值与实际测定值一致,因此该模型可用于青梗不结球白菜耐热性综合评价模型。本试验筛选品种可为蔬菜种植户夏秋季节渡淡种植提供选择。本研究构建了不结球白菜耐热性与抗氧化指标的评估体系,并探究了抗氧化指标与耐热性之间的关系,这对加快今后不结球白菜的抗热育种具有重要意义。

参考文献:

- [1] 叶静渊. 我国油菜的名实考订及其栽培起源[J]. 自然科学史究, 1989, 8(2): 158-165
- [2] Cheng Y, Geng J F, Zhang J Y, Wang Q, Ban Q Y, Hou X L. The construction of a genetic linkage map of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* makino) [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2009, 36(8): 501-508
- [3] Liu T K, Dai W, Sun F F, Yang X D, Xiong A S, Hou X L. Cloning and characterization of the nitrate transporter gene *brant2.1* in non-heading Chinese cabbage [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(4): 815-823
- [4] 侯喜林, 宋小明. 不结球白菜种质资源的研究与利用[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(5): 35-42
- [5] Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination [J]. Trends in Plant Science, 2005, 11(1): 15-19
- [6] Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad M. Heat tolerance in plants: an overview [J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 61(3): 199-223
- [7] 胡俏强. 不结球白菜耐热性鉴定方法及其耐热基因片段克隆研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011
- [8] 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
- [9] Fujita S, Saari N, Maegawa M. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(50): 128-132
- [10] 吴国胜, 曹婉虹, 王永健, 姜亦巍, 张丽蓉. 细胞膜热稳定性及保护酶和大白菜耐热性的关系 [J]. 园艺学报, 1995(4): 353-358
- [11] 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(4): 115-118
- [12] 董文科, 路旭平, 姜寒玉, 马晖玲. 多年生黑麦草 EMS 诱变与耐旱性评价 [J]. 核农学报, 2018, 32(10): 1889-1897

- [13] 全倩, 施明, 贺建勋, 徐美隆. 5 种葡萄砧木耐旱性评价及鉴定指标的筛选[J]. 核农学报, 2018, 32(9): 1814–1820
- [14] 李晓芬, 尚庆茂, 张志刚, 王立浩, 张宝玺. 多元统计分析方法在辣椒品种耐盐性评价中的应用[J]. 园艺学报, 2008, 35(3): 351–356
- [15] 孟林, 尚春艳, 毛培春, 张国芳, 安沙舟. 偃麦草属植物种质材料苗期耐盐性综合评价[J]. 草业学报, 2009, 18(4): 67–74
- [16] 刘维信, 曹寿椿. 夏季自然高温条件下不结球白菜品种评价及相关性状的研究[J]. 山东农业大学学报, 1993, 24(2): 176–182
- [17] 胡俏强, 陈龙正, 张永吉, 徐海, 宋波, 苏小俊, 袁希汉. 普通白菜苗期耐盐性鉴定方法研究[J]. 中国蔬菜, 2011, 31(2): 56–61
- [18] 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, 1999
- [19] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990
- [20] 吴华. AsA-GSH 循环参与海滨木槿盐应答机制的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2015
- [21] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进[J]. 云南植物研究, 2005, 27(2): 211–216
- [22] 门立志, 王毅, 曹云娥, 陈青云, 田永强, 高丽红. 不同黄瓜品种苗期耐盐性指标筛选与评价体系构建[J]. 中国蔬菜, 2013, 33(22): 20–26
- [23] 田治国. 万寿菊属植物耐热性与抗旱性的评价及生长生理特性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012
- [24] 周亚峰, 许彦宾, 王艳玲, 李琼, 胡建斌. 基于主成分-聚类分析构建甜瓜幼苗耐冷性综合评价体系[J]. 植物学报, 2017, 52(4): 520–529
- [25] 韩瑞宏, 赵大华, 陈晶晶, 卢少云, 郭振飞. 不同苜蓿种质资源苗期耐热性综合评价[J]. 中国草地学报, 2015, 37(3): 48–54
- [26] 韩冬梅, 于卫东, 吴振先. 荔枝果实贮藏性能理化指标评估体系的构建[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(4): 360–366
- [27] 郝鲜俊, 韩阳, 张又丹, 高文俊, 罗园园, 张凯珏. 基于主成分-聚类分析评价接种 AM 真菌对采煤塌陷区土壤质量的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(4): 789–796
- [28] Scandalios J. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses[J]. Cold Spring Harbor Laboratory, 1997, 11(26): 527–568
- [29] 赵天宏, 孙加伟, 付宇. 逆境胁迫下植物活性氧代谢及外源调控机理的研究进展[J]. 作物杂志, 2008, 6(3): 10–13
- [30] 李国婧. 超氧阴离子的产生及其在植物体内作用的研究[J]. 生物技术世界, 2012, 10(4): 24–25
- [31] 张娜. 褪黑素处理对渗透胁迫下黄瓜种子萌发及幼苗生长的影响及其分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2014
- [32] 付正来. 氟胁迫对茶树抗氧化特性的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013
- [33] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schrauder M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants[J]. The EMBO Journal, 1997, 16(16): 4806–4816
- [34] 赵萌. 外源 NO 调控吸胀冷害下紫花苜蓿种子萌发及抗冷性的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014
- [35] 王平. 黄瓜高温闷棚及嫁接有关的栽培生理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016

Establishment of Evaluation System for Antioxidant Index of Heat Tolerance of Green Stalks of Non-heading Chinese Cabbage

ZOU Kaixi¹ YANG Yan² TIAN Libo^{1,*} SHANG Sang¹ ZENG Liping¹

GUO Xuesong¹ LIU Ziji² ZHU Guopeng¹

(¹College of Horticulture, Hainan University/The Key Laboratory of Tropical Horticultural Crop Quality Regulation of Hainan Province, Haikou, Hainan 570228; ²Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: In order to explore the germplasm resources and recommend excellent variety of heat-tolerant non-heading Chinese cabbage for production, this study applied multivariate statistical method to comprehensively analyze the antioxidant related indexes of 19 green stalks of non-heading Chinese cabbage with high temperature stress treated. Results showed that after 5 days of high temperature stress, the average coefficient of variation of each index for different cultivar was 33.26%. The rate of superoxide anion radical generation is significantly different among varieties, and the other indicators are significantly different. The correlations of these indexes reached significant level and six of them are most significant; the rate of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) production was significant and positively correlated with the content of hydrogen peroxide (H_2O_2). Thirteen indicators were converted into 5 domain components which explained 74.5% of the source of difference. According to the principal component score, the membership function was calculated to obtain the comprehensive index D value, and the tested materials were ranked. The top three heat-tolerance varieties were Qing 16, Qing 20 and Qing 2, and the last three were Qing 1 and Qing 8 and Qing 15. According to the D value, 19 kinds of green stalks non-heading Chinese cabbage were clustered into three clusters. In the comprehensive evaluation of clustering results, APX, AsA, MDA, POD heat-tolerance coefficient, and HII are inversely proportional to heat-tolerance. The comprehensive evaluation model $D = 0.75275 - 0.02190APX - 0.04248MDA - 0.03408AsA - 0.07984POD - 0.22561HII$ is obtained by multiple regression analysis which can be used as a comprehensive evaluation model for heat tolerance of green stalks non-heading Chinese cabbage. These results provided a scientific and accurate evaluation system for heat tolerance resources exploitation and cultivars selected breeding of non-heading Chinese cabbage.

Keywords: non-heading Chinese cabbage, green stalk, principal component analysis, membership function, heat-tolerance