

# 干旱胁迫下外源激素对大豆叶片表皮透性及蜡质微形态影响

王丽娜,金 勋,杨 柳,潘红丽,芮海英,李 娜,李泽宇,齐国超

(黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316)

**摘 要:**利用外源激素 ABA、ETH 处理大豆幼苗,通过人工控水研究外源激素喷施对大豆生理及叶片表皮蜡质微形态的影响。结果表明:当 ABA、ETH 处理 14 d 时,各处理之间叶片的相对含水量、叶绿素含量无明显差异,叶片失水率则表现为当离体叶片失水 80 min 后 ABA、ETH 处理低于 CK。当 ABA、ETH 处理 28 d 时,各处理相对含水量明显高于 14 d,ABA 处理与 ETH、CK 处理之间叶片相对含水量差异显著,ETH 与 CK 处理之间叶片相对含水量差异不显著;各处理的叶绿素含量低于 14 d 的含量,ABA 处理的叶片叶绿素含量与 ETH 处理差异显著,与 CK 处理差异不显著;各处理叶片的失水率不断增加,当离体叶片失水 60 min 时 ABA、ETH 处理的叶片失水率趋于相同,显著的高于 CK 处理。ABA、ETH、CK 处理 28 d,扫描电镜观察大豆叶片表皮蜡质呈棒条状,处理之间数量无明显差异,而 ETH 处理的茎秆表皮的蜡质数量明显少于 ABA、CK 处理,呈片状结构。

**关键词:**相对含水量;失水率;叶绿素;表皮蜡质数量

**中图分类号:**S565. 1      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2018. 02. 0246

## Effects of Exogenous Hormones on Cuticular Permeability and Wax Micromor- phology of Soybean Leaves under Drought Stress

WANG Li-na, JIN Xun, YANG Liu, PAN Hong-li, RUI Hai-ying, LI Na, LI Ze-yu, QI Guo-chao

(Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

**Abstract:** The effects of exogenous hormone ABA and ETH spraying on soybean physiology and leaf epidermal wax morphology were studied by artificial water control, which laid the foundation for later study on physiological and molecular mechanisms of drought resistance in soybean. The results showed that ABA and ETH were treated with 14 d, the relative water content and chlorophyll content of leaves were not significantly different among the treatments, the water loss rate of ABA and ETH treated leaves were lower than CK after 80 min of water loss. On 28d, the relative water content of hedehydrated leaves in vitro ABA, ETH were significantly higher than that of 14 d, the relative leaf water content of ABA was significantly between ETH and CK treatment, there was no significant difference between ETH and CK; the chlorophyll content was lower than the content of 14 d, the leaf chlorophyll content of ABA treatment and ETH treatment were significant difference, ABA treatment and CK treatment had no significant difference; the leaf water loss rate of each treatment was progressively increased, after 60 min the rate of ABA and ETH tended to be the same. The ABA, ETH and CK treatments of 28 d, scanning electron microscope observa-tion of soybean leaf epidermis wax was stick bar with no significant difference in number, and stem epidermis wax number of ETH treatment was significantly less than ABA and CK treatment, presented sheet structure.

**Keywords:** Relative water content; Water loss rate; Chlorophyll content of leaves; Wax number of epidermis

非环境胁迫下生物体为能够正常生长会启动自身一系列生理生化反应,产生复杂的防御机制,抵御外界不利因素的影响。植物内源激素在植物生长发育及应对非生物胁迫的防御反应中起到调控作用<sup>[1]</sup>。脱落酸(ABA)、乙烯利(ETH)是植物体内的重要胁迫激素,它们不仅在植物生长发育中起到调节作用,还能够在植物低温、干旱和高盐等环境胁迫中产生应答,是植物对逆境胁迫的防卫机制成员<sup>[2]</sup>。外源 ABA 的喷施可以增加植物或细胞对干旱的抗性<sup>[3]</sup>,ABA 调控作用是通过关闭气孔、保持组织内的水分平衡、增强根对水的透性等来增加植物的抗性的<sup>[4]</sup>。外源 ETH 喷施能够诱导番茄、豌豆和萝卜等植物产生防御机能,增强植物的抗病

性<sup>[5]</sup>。ETH 还能诱导大豆叶片内与抗病性相关的生化指标发生变化<sup>[1]</sup>。

植物表皮蜡质是植物与环境接触的第一道屏障,能够在多种环境胁迫中对植物提供保护作用<sup>[1]</sup>。研究表明水分胁迫下 ABA 通过上调转录因子 MYB96 的表达而促进蜡质合成基因的表达,最终促进蜡质的积累<sup>[6]</sup>。ETH 还能够诱导柑桔表皮蜡质含量增加及结构变化,阻止 *P. digitatum* 入侵<sup>[7]</sup>。目前,对于外源激素的喷施对大豆生理生化的影响的相关研究多集中在 MDA、可溶性糖、可溶性蛋白以及过氧化物含量的产生上,而对大豆叶片的表皮透性及蜡质形态的研究较为少见。本试验主要目的是利用 ABA、ETH 处理干旱胁迫下的大豆幼苗,

测定激素处理后叶片相对含水量、叶片离体失水率、叶绿素含量,观察激素处理和喷施清水的大豆叶片、茎秆表皮蜡质的形态数量,比较处理之间指标变化,分析外源激素处理对表皮蜡质形态数量与相对含水量、表皮透性的影响,为干旱胁迫下大豆的抗逆生理及分子机制的研究提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验开始于2017年,在黑龙江省农业科学院大庆分院温室进行。选择大豆品种为抗线12,由黑龙江省农业科学院大庆分院抗线大豆研究中心提供;ABA、ETH均购自硕博顺达试剂耗材销售公司;叶绿素仪SPAD-502;扫描电镜型号S-3400N(HITACHI)。

选取籽粒饱满,无病斑的大豆,选择上径15 cm,下径10 cm的塑料盆,装土并称量,浇透水后播种每盆3~5株,处理前每天浇灌50 mL清水。待初花期保持每盆3株并通过测定相对含水量40%~50%进行控水,模拟干旱条件采取3种方式处理大豆植株,分别为100 μmol·L<sup>-1</sup>(每升加3~4滴吐温20) ABA,200 mmol·L<sup>-1</sup>(每升加3~4滴吐温20) ETH,(清水对照)CK,每天中午喷施叶片1次,每处理喷施1 L,3次重复,总计450盆。各处理实施14 d,28 d选取顶端完全展开复叶,用于叶片相对含水量、离体失水率、叶绿素含量的测定;随机选取处理28 d后的大豆植株用于叶片、茎秆表皮蜡质形态数量观察。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 叶片相对含水量 参照张志良等<sup>[8]</sup>称重法:每处理随机取3株,3次重复。剪取各处理每株叶片,用电子天平称取其鲜重D<sub>1</sub>;之后将叶片放入盛有适量双蒸水的培养瓶中,塞进瓶塞,将叶片浸泡24 h,用吸水纸吸干表面的水分,称重,即为饱和鲜重D<sub>2</sub>;将吸水的叶片放入80℃的烘箱中,烘干,直至其质量达到恒重,称重,即其干重D<sub>3</sub>;计算其相对含水量。叶片相对含水量(RWC)=(D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>)/(D<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)×100%。

1.2.2 叶片离体失水率 参照朱双艳等<sup>[9]</sup>的文献方法:每处理随机取3株,3次重复,将整株叶沿叶耳切断,迅速置于去离子水中,放于黑暗处,60 min后将叶片取出轻轻甩掉多余水分,并用滤纸吸干,用微量天平每隔20 min称重直至120 min,所测数据用初始饱水鲜重的百分数表示;离体失水率(%)=(W<sub>1</sub>-W<sub>2</sub>)/W<sub>1</sub>×100。W<sub>1</sub>:离体叶片失水前的重量;W<sub>2</sub>:离体叶片失水0,20,40,60,80,100,120 min

后的重量。

1.2.3 叶绿素含量 利用SPD-502分别测定固定株数处理14和28 d的大豆叶片,每处理取5株,测定叶基、叶中、叶尖的叶绿素含量,取平均值。

1.2.4 表皮蜡质形态观察 参照Barthlott等<sup>[10]</sup>的方法:将大豆叶片和茎秆利用双面刀片切成2 mm×5 mm的小条,加入2.5%,pH6.8戊二醛固定并置于4℃冰箱中固定1.5 h以上,利用0.1 mol·L<sup>-1</sup>,pH6.8磷酸缓冲液冲洗二次,每次10 min;再分别利用浓度为50%、70%、90%的乙醇进行脱水一次,每次15 min;100%乙醇脱水2次,每次10 min后,然后将材料转入叔丁醇静止15 min,再将材料放入-20℃的冰箱冷冻30 min,放入ES-2030(HITACHI)型冷冻干燥仪对材料进行干燥4 h;将材料观察面向上,用导电胶带粘在扫描样品台上;再用E-1010(HITACHI)型离子溅射镀膜,置于样品盒中用于观察。

1.3 数据分析

采用Excel 2000和SPSS 19.0进行作图和数据分析。

2 结果与分析

2.1 外源ABA和ETH对干旱胁迫下大豆叶片相对含水量的影响

研究表明,干旱胁迫下大豆叶片受外源ABA、ETH、CK处理14 d时,处理之间叶片的相对含水量分别为61.3%、62.8%、64.2%,差异不显著;当处理持续到28 d时,ABA、ETH、CK处理叶片相对含水量分别达到了77.8%、76.6%、72.8%,均极显著高于14 d的处理(P<0.01),28 d时,ABA处理的叶片相对含水量显著高于ETH、CK处理,ETH、CK处理之间叶片相对含水量差异不显著(图1)。

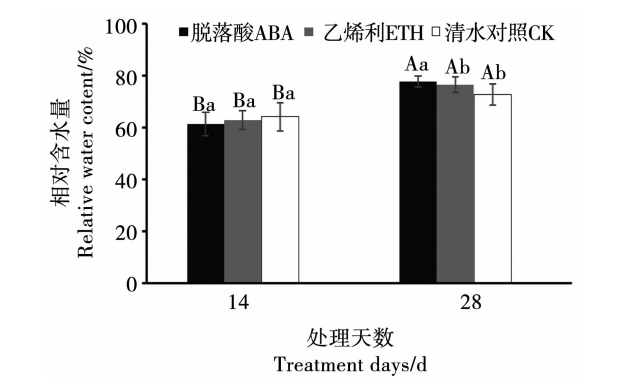


图1 不同时期外源ABA,ETH对干旱胁迫下大豆叶片相对含水量的影响

Fig.1 Effects of exogenous ABA and ETH on relative water content of soybean leaves under drought stress at different stages

## 2.2 外源 ABA 和 ETH 对干旱胁迫下大豆叶片叶绿素含量及离体失水率的影响

2.2.1 叶绿素含量 由图 2 可知,在干旱胁迫下植株的叶绿素含量均呈现下降趋势,外源 ABA,ETH 处理 14 d 的大豆叶片叶绿素含量维持在 34.7 ~ 35.8 SPAD 左右,处理之间叶片叶绿素含量差异不显著;随处理时间的延长,处理 28 d 时,各处理的叶绿素含量较处理 14 d 的含量明显的下降,维持在 25.6 ~ 30.7 SPAD 左右,并且 ABA 处理的叶片叶绿素含量显著高于 ETH 处理,与 CK 处理差异不显著。

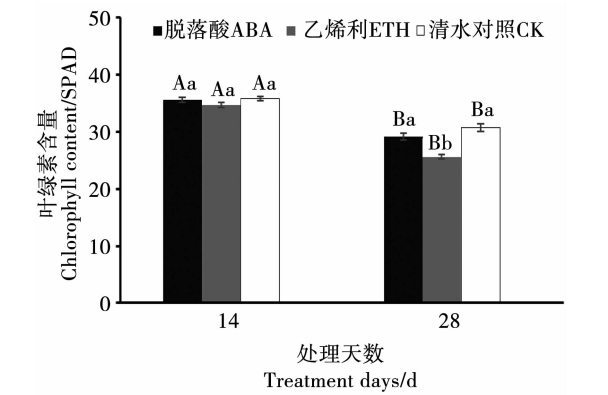


图 2 不同时期外源 ABA 和 ETH 对干旱胁迫下大豆叶片叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effects of exogenous ABA and ETH on chlorophyll content in soybean leaves under drought stress at different stages

2.2.2 离体失水率 由图 3 可知,干旱胁迫下外源 ABA、ETH、CK 处理 14 d 的大豆叶片失水率在叶片失水 20,40,60 min 时各处理数值趋于相同,离体叶片失水 80 min 后各处理的叶片失水率差异显著,ABA、ETH 处理的叶片失水率低于 CK 处理;随着处理时间的延长,28 d 时叶片的失水率不断增加,离体叶片失水 20 和 40 min 的 ETH 处理的大豆叶片失水率高于 ABA、CK 处理,当叶片失水 60 min 时 ABA、ETH 处理的叶片失水率趋于相同,显著高于

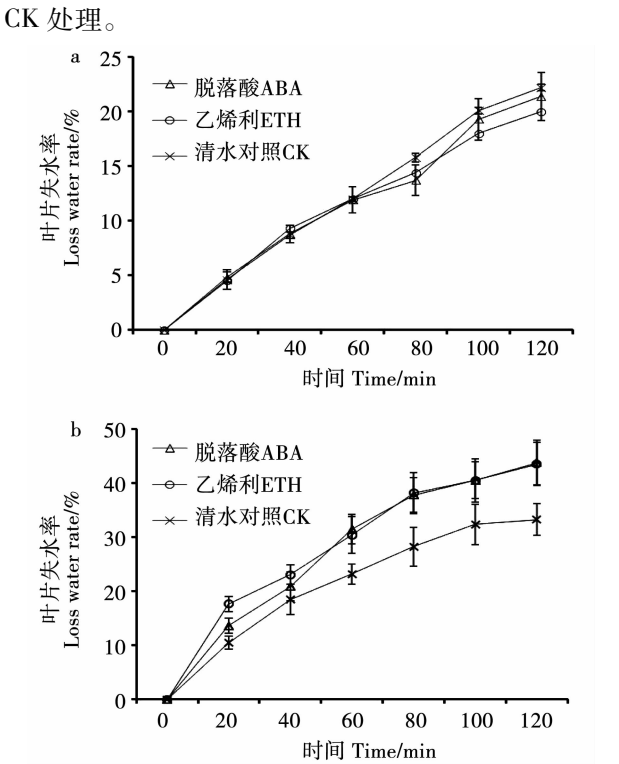


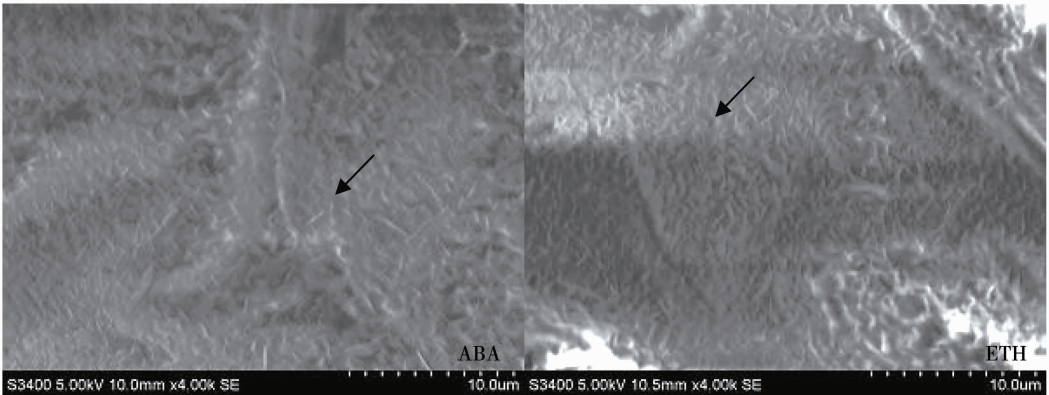
图 3 干旱胁迫 14 d(a) 和 28 d(b) 时外源 ABA、ETH 大豆叶片失水率的影响

Fig. 3 Effects of exogenous ABA and ETH on water loss rate of soybean leaves under drought stresson 14(a) and 28(b) d

## 2.3 外源 ABA 和 ETH 处理对干旱胁迫下大豆叶片及茎秆蜡质数量和结构的影响

从图 4 可看出,在扫描电镜 4000SE 下观察大豆叶片表皮蜡质,ABA,ETH,CK 处理蜡质排列紧凑,数量结构大小相差不明显,如箭头所示呈棒条状。

从图 5 可看出,在扫描电镜 2000SE 下观察大豆茎秆蜡质发现,ABA、CK 处理蜡质排列紧凑,如箭头所示呈片状,数量多,两处理相差不明显,而 ETH 处理蜡质排列疏松、数量少,零散镶嵌,与 ABA、CK 处理相比蜡质数量明显减少。



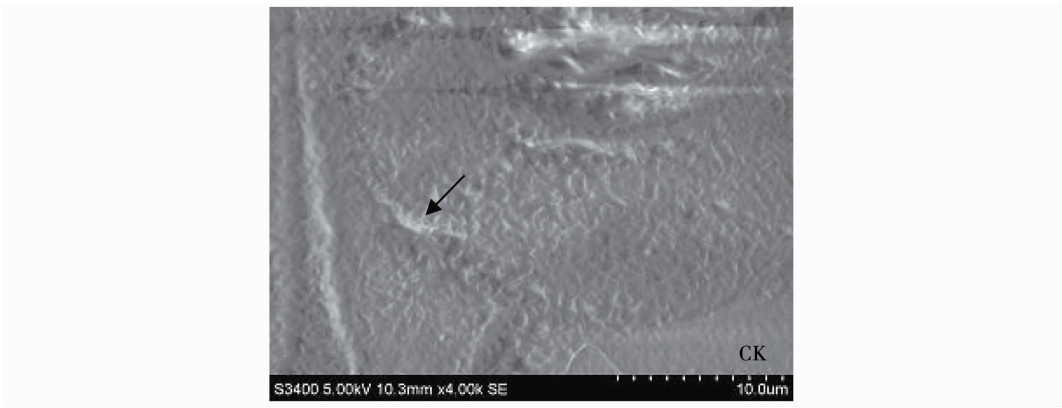


图 4 外源 ABA、ETH、CK 处理干旱胁迫下大豆叶片蜡质数量及结构分布图

Fig. 4 Wax number and structure distribution of soybean leaves under drought stress treated with exogenous ABA、ETH and CK

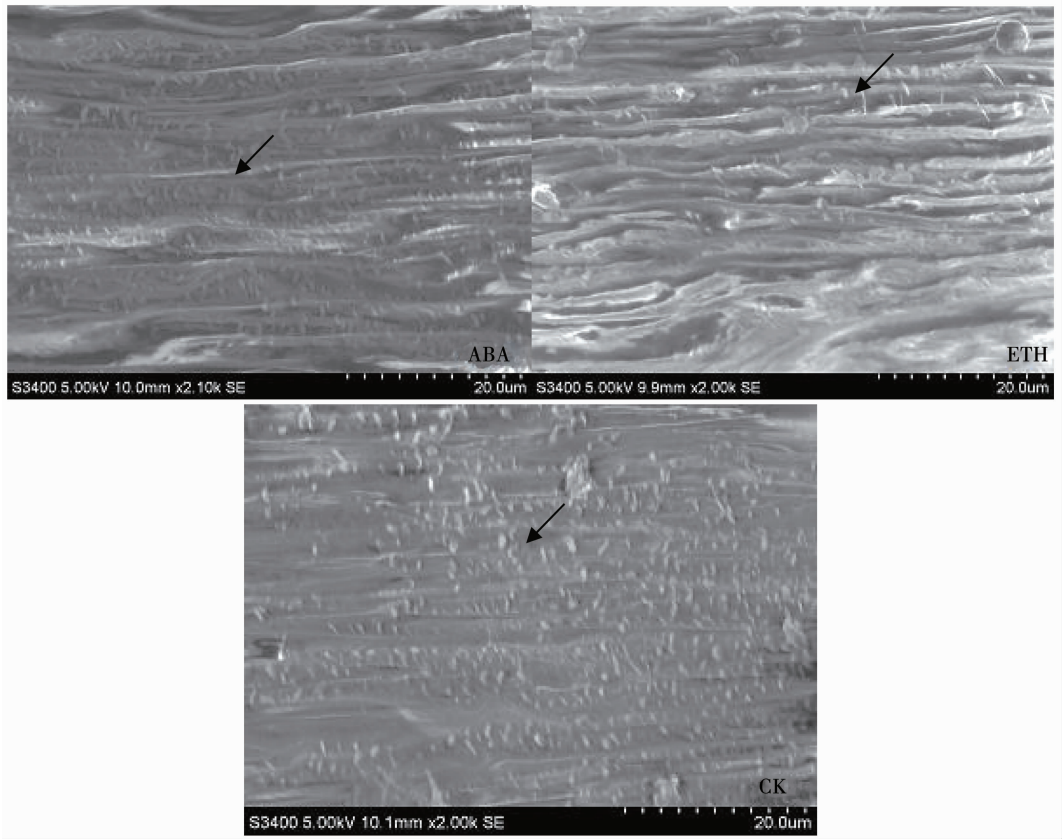


图 5 外源 ABA、ETH、CK 处理干旱胁迫下大豆茎秆蜡质数量及结构分布图

Fig. 5 Wax number and structure distribution of soybean stem under drought stress treated with exogenous ABA, ETH and CK

3 讨 论

3.1 外源 ABA 处理对大豆叶片表皮蜡质、相对含水量及离体失水率的影响

叶片的相对含水量和离体失水率等指标对水分亏缺反应敏感,通常被用作抗旱性鉴定的重要指标<sup>[11]</sup>。研究发现,利用 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 喷施大麦和 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 喷施甘薯幼苗均可显著提高幼苗叶片的相对含水量,降低叶片的离体失水率<sup>[9,12]</sup>。对芝麻、茄子、甘蔗、地被菊等研究发现,干

旱胁迫下喷施 ABA 能延缓叶片含水量的降低,延缓叶绿素含量下降<sup>[13]</sup>。在本研究中,关于叶片相对含水量研究结果与研究者的结论一致,而处理 14 d 时 ABA、ETH 处理叶片失水率与 CK 相比下降,处理 28 d 后的叶片失水率相比 CK 明显增高。叶绿素含量在 14 和 28 d 处理呈现出先升高后降低的趋势,ABA 处理的叶绿素含量高于 ETH 处理,与 CK 处理无差异。说明外源喷施 ABA 对大豆叶片蒸腾作用不稳定,光合作用不明显。从而 ABA 处理的叶片表皮蜡质的数量,形态结构与 CK 处理无明显区别。



3.2 外源 ETH 处理对大豆叶片表皮蜡质、相对含水量、离体失水率的影响

研究表明,乙烯能够诱导柑桔表皮蜡质含量的增加及结构变化,阻止病原菌的入侵<sup>[14]</sup>。当玉米三叶期喷施 400 mg·L<sup>-1</sup> 乙烯利,干旱处理 7 d 后发现,乙烯利处理提高了叶片水势,相对含水量,降低了叶片萎蔫程度;电镜扫描结果显示,干旱胁迫下乙烯利处理玉米植株叶片表面蜡质晶体颗粒覆盖率比对照植株高<sup>[15]</sup>。通过扫描电镜对喷施乙烯利油菜表皮进行蜡质观察,发现当处理 15 d 时,叶片表皮部分区域蜡质晶体熔融成片,短柱状结构增加,处理 25 d 时,蜡质晶体熔融区域扩大,部分气孔被覆盖,短柱状结构进一步增加<sup>[1]</sup>。本研究中,乙烯利处理的大豆叶片的相对含水量随处理时间延长而提高,失水率随处理时间延长而呈现出先降低后升高的趋势;叶绿素含量低于对照处理。叶片中蜡质的数量和形态与其它处理变化不明显,都为棒条状,而茎秆中蜡质数量分布明显少于 ABA,CK 处理,形态呈片状。结果可看出 ETH 对大豆的抗旱发挥出抑制作用,主要表现出茎秆中蜡质数量的大量减少。

4 结 论

通过本研究可知,经 ABA、ETH 喷施的大豆幼苗,当处理 14 d 时,ABA、ETH 对叶片的相对含水量,叶绿素含量影响不明显,而与 CK 相比较显著降低叶片失水率,说明外源激素作用导致叶片气孔关闭降低蒸腾作用。当处理时间延长 28 d 时,ABA 对叶片的相对含水量、叶绿素含量显著高于 ETH,而叶片失水率增加,表明 ABA 可能缓慢调控叶片的水分挥发维持生长平衡状态,进而发挥抗旱的作用,ETH 对大豆抗旱性作用效果不明显。ABA、ETH 的喷施对大豆叶片蜡质数量、形态影响不明显,ETH 的喷施明显减少大豆茎秆中蜡质的数量,可能参与非生物胁迫下大豆茎秆蜡质的合成。

参考文献

[1] 王小清. 乙烯对油菜叶表皮蜡质的调控机制研究[D]. 重庆: 西南大学,2015. (Wang X Q. Study on the mechanisms of ethylene in regulating *Brassica napus* leaf cuticular waxes [D]. Chongqing: Southwest University,2015. )

[2] 陈娟,潘开文,辜彬. 逆境胁迫下植物体内脱落酸的生理功能和作用机制[J]. 植物生理学通讯,2006,42 (6) : 1176-1182. (Chen J, Pan K W, Gu B. Physiological function and mechanism of abscisic acid in plants under stress[J]. Plant Physiology Communications,2006,42 (6) : 1176-1182. )

[3] 金毅,郑浩宇,金喜军,等. 外源 ABA、SA 及 JA 对干旱胁迫及复水下大豆生长的影响[J]. 大豆科学,2016,35 (6) :958-963. (Jin Y, Zheng H Y, Jin X J, et al. Effect of ABA, SA and JA on soybean growth under drought stress and re-watering[J]. Soybean

Science,2016,35 (6) :958-963. )

[4] 魏鑫,倪虹,张会慧,等. 外源脱落酸和油菜素内酯对干旱胁迫下大豆幼苗抗旱性的影响[J]. 中国油料作物学报,2016,38 (5) :605-610. (Wei X, Ni H, Zhang H H, et al. Effects of exogenous abscisic acid and brassinolide on drought resistance of soybean seedlings[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2016,38 (5) :605-610. )

[5] 刘亚光,李海英,杨庆凯,等. 乙烯利对大豆抗性生化物质的诱导作用[J]. 哈尔滨工业大学学报,2004,36 (8) :1014-1016. (Liu Y G, Li H Y, Yang Q K, et al. Induction of resistance substances in soybean by ethylene[J]. Journal of Harbin Institute of Technology,2004,36 (8) :1014-1016. )

[6] Koch K, Barthlott W. Plant epicuticular wax: Chemistry, form, self-assembly and function[J]. Natural Product Communications, 2006,1 (11) :1067-1072.

[7] Nordby H E, McDonald R E. Squalene in grape fruit wax as a possible natural protectant against chilling injury [J]. Lipids, 1990,25 (12) :807-810.

[8] 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,2003:1-3. (Zhang Z L, Qu W J. The experimental guide for plant physiology [M]. Beijing:Higher Education Press,2003. 1-3. )

[9] 朱双艳,齐军仓,惠宏斌,等. 大麦幼苗叶片表皮蜡质组分及含量对外源 ABA 的响应及其对表皮透性的影响[J]. 西南农业大学学报,2015,28 (5) :1965-1971. (Zhu S Y, Qi J C, Hui H B, et al. Responses of epicuticular wax components and contents of barley seedling leaves to exogenous abscisic acid treatment and its impact on epidermal permeability[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences,2015,28 (5) :1965-1971. )

[10] Barthlott W, Neinhuts C, Cutler D, et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes[J]. Botanical Journal of the Linnean Society,1998,126 (3) :237-260.

[11] 白志英,李村东,孙红春,等. 干旱胁迫对小麦染色体代换系旗叶相对含水量和离体是谁速率的影响[J]. 华北农学报, 2008,23 (1) :62-65. (Bai Z Y, Li C D, Sun H C, et al. Effect of drought stress on relative water content and RWL of flag leaves in wheat chromosome substitution lines[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2008,23 (1) :62-65. )

[12] 孙哲,范维娟,刘桂玲,等. 干旱胁迫下外源 ABA 对甘薯苗期叶片光合特性及相关生理指标的影响[J]. 植物生理学报, 2017,53 (5) :873-880. (Sun Z, Fan W J, Liu G L, et al. Effects of exogenous ABA on leaf photosynthetic characteristics and associated physiological indexes of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) seedlings under drought stress[J]. Plant Physiology Journal,2017,53 (5) : 873-880. )

[13] 李杨,毛洪玉,马磊,等. 干旱胁迫下外源喷施 ABA 对地被菊生理特性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2015 (6) :61-64. (Li Y, Mao H Y, Ma L, et al. Effect of application of ABA on physiological characteristics of chrysanthemum under drought stress[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2015 (6) :61-64. )

[14] Nordby H E, McDonald R E. Squalene in grape fruit wax as a possible natural protectant against chilling injury [J]. Lipids, 1990,25 (12) :807-810.

[15] 张钰石,谢燕,吴佩倩,等. 乙烯利对玉米叶片表皮蜡质形态调控及其响应干旱机制[C]. 全国青年作物栽培与生理学术研讨会,2014. (Zhang Y S, Xie Y, Wu P Q, et al. Regulation of ethylene on cultivar wax morphology in maize leaves and its response to drought [C]. National Symposium on crop cultivation and physiology,2014. )