

# 盐胁迫对大豆发育子叶愈伤组织的生化影响<sup>\*</sup>

马淑英 尹田夫

(中国人民解放军农牧大学, 长春 130062)

袁 鹰 刘德璞 刘艳芝

(吉林省农科院大豆所, 公主岭 136100)

## 摘 要

在含不同浓度 NaCl 的 MS 培养基上, 继代 5 次培养大豆发育子叶的愈伤组织, 分析了不同盐浓度培养的大豆愈伤组织的蛋白质、氨基酸和可溶性糖的含量。经测定表明, 盐胁迫下, 大豆愈伤组织的蛋白质、总氨基酸含量都比对照高, 可溶性糖含量比对照低。NaCl 浓度在 0~0.1% 范围内, 随 NaCl 浓度的增加, 蛋白质与总氨基酸的含量逐渐增加, 当 NaCl 浓度增至 0.15% 时, 蛋白质和总氨基酸含量又降低。在含 NaCl 0.07% 培养基中, 大豆愈伤组织的脯氨酸含量最高, 为对照的 2.72 倍。盐胁迫下, 脯氨酸、丙氨酸、精氨酸和组氨酸的含量变化与总氨基酸含量变化不一致。

**关键词** 大豆; 愈伤组织; 盐胁迫; 蛋白质; 氨基酸; 可溶性糖

目前, 我国有 3 亿多亩盐碱地和 1 亿多亩盐渍化土壤, 约占耕地面积的 25%, 因此培育优良的耐盐碱的作物品种, 充分利用土地资源具有十分重要的实践意义。

近年来, 利用组织培养技术研究植物的耐盐机理已有不少报道, 本文在前人研究基础上, 进一步研究了不同盐浓度胁迫大豆发育子叶愈伤组织的蛋白质、氨基酸、可溶性糖的变化趋势, 为探寻作物的耐盐机理提供理论基础。

## 材料和方法

### 一、植物材料

<sup>\*</sup> 本文于 1996 年 2 月 2 日收到。  
This paper was received on Feb. 2, 1996.

大豆 ( *Glycine max* )品种“小粒 1号”由吉林省农业科学院大豆所提供

二、实验方法

1 大豆愈伤组织的获得

取幼嫩的大豆种子 ,剥去种皮 ,切除与胚轴连接的部位 ,将子叶切成 0. 5~ 1mm厚的薄片 ,用 75% 乙醇消毒 5分钟 ,然后倾出乙醇 ,加入 0. 1% HgCl<sub>2</sub> ,不时摇动 ,消毒 2~ 3分钟 ,用无菌水清洗 2遍 ,把薄片接种在已灭菌的 MS培养基上 ,诱导愈伤组织的形成 MS培养基为 MS培养基附加 2mg/L 2<sup>+</sup> 4- D, 0. 5mg/L 6BA, 3% 蔗糖 ,0. 7% 琼脂 ,pH5. 8

2 盐胁迫培养

取已获得的愈伤组织直接接种到不同浓度的盐胁迫培养基 MS<sub>1</sub> MS<sub>2</sub> MS<sub>3</sub> MS<sub>4</sub> MS<sub>5</sub>上 ,其 NaCl的浓度依次为 0 0. 05%、0. 07%、0. 10%、0. 15% ,均在 25℃条件下培养 ,每一个月继代培养一次 ,共 5代 ;取颜色较一致的愈伤组织分别进行测定 ,重复三次 ,取平均值

3 生化分析方法

蛋白质含量分析 :用半微量凯氏定氮法测定。

氨基酸组分分析 :取 0. 5g 大豆愈伤组织干粉 ,在 105℃条件下用盐酸水解 24小时 ,以 NaOH中和后 ,再用日立 835氨基酸测定仪测定。

可溶性糖含量测定 :采用蒽酮法 ,取 0. 5g大豆的新鲜愈伤组织 ,提取糖类 ,并在 723分光光度计上进行比色测定。

结果与分析

一、不同盐胁迫下 ,大豆愈伤组织的形态

经 5次继代培养 ,发现对照组 MS<sub>1</sub> 盐胁迫的 MS<sub>2</sub>组和 MS<sub>3</sub>组长势较好 ,MS<sub>4</sub>组生长弱些 ,MS<sub>5</sub>组生长缓慢 ,大豆愈伤组织的颜色亦随盐浓度的增加 ,由黄色逐渐变至褐黄色 ,如表 1

表 1 不同盐浓度下大豆愈伤组织的形态

| Table 1 The morphology of soybean callus tissue under different concentration of NaCl |                 |                 |                 |                 |                 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 愈伤组织  | 0. 0            | 0. 05           | 0. 07           | 0. 10           | 0. 15           |
| Callus  | MS <sub>1</sub> | MS <sub>2</sub> | MS <sub>3</sub> | MS <sub>4</sub> | MS <sub>5</sub> |
| 生长  | 旺盛              | 旺盛              | 较旺盛             | 较弱              | 弱               |
| Growth  |                 |                 |                 |                 |                 |
| 颜色  | 黄色              | 黄色              | 黄绿色             | 黄褐色             | 褐黄色             |
| Colour  |                 |                 |                 |                 |                 |
| 细胞排列  | 松散              | 松散              | 较松散             | 较紧密             | 紧密              |
| Range of cell   |                 |                 |                 |                 |                 |

二、大豆愈伤组织的生化分析

(一)蛋白质含量

盐胁迫的愈伤组织粗蛋白含量均比对照高 ,而同在盐胁迫下 ,蛋白质的含量也有区别。NaCl浓度在 0~ 0. 1% 之间 ,随着 NaCl浓度的增加 ,粗蛋白含量从 23. 55% 增至

32.78% ,当 NaCl浓度增到 0.15%时 ,大豆愈伤组织的粗蛋白含量反而下降到 30.84%。

表 2 盐胁迫对大豆愈伤组织粗蛋白质含量的影响

|  |                  |                  |                  |                  |                  |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Table 2 Effect of NaCl on the contents of protein in soybean callus tissue |                  |                  |                  |                  |                  |
| NaCl浓度   | 0.0              | 0.05             | 0.07             | 0.10             | 0.15             |
| Concentration of NaCl (%)  | M S <sub>1</sub> | M S <sub>2</sub> | M S <sub>3</sub> | M S <sub>4</sub> | M S <sub>5</sub> |
| 粗蛋白质含量   | 23.55            | 26.78            | 28.70            | 32.78            | 30.84            |
| Content of protein (%)   |                  |                  |                  |                  |                  |

由表 2可看出 ,随着 NaCl浓度增加 ,粗蛋白含量逐渐升高 ,蛋白质含量最高为 32.78% ,比对照增高了 39.19% ,而后又降低 ,其变化如图 1

(二)氨基酸含量

表 3 盐胁迫对大豆愈伤组织氨基酸含量的影响

|   |                                       |                  |                  |                  |                  |
|---|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Table 3 Effect of NaCl on the contents of amino acids of soybean callus under salt stress |                                       |                  |                  |                  |                  |
| 氨基酸   | 氨基酸含量 (g /100g) Content of amino acid |                  |                  |                  |                  |
| Amino acid  | M S <sub>1</sub>                      | M S <sub>2</sub> | M S <sub>3</sub> | M S <sub>4</sub> | M S <sub>5</sub> |
| 天冬氨酸 ( Asp)   | 1.26                                  | 1.84             | 1.87             | 2.41             | 1.88             |
| 苏氨酸 ( Thr)  | 0.49                                  | 0.70             | 0.73             | 0.79             | 0.77             |
| 丝氨酸 ( Ser)  | 0.68                                  | 0.94             | 0.98             | 1.04             | 0.99             |
| 谷氨酸 ( Glu)  | 1.26                                  | 1.90             | 2.06             | 2.18             | 2.05             |
| 脯氨酸 ( Pro)  | 0.87                                  | 1.10             | 2.37             | 1.61             | 1.23             |
| 甘氨酸 ( Gly)  | 0.50                                  | 0.73             | 0.75             | 0.80             | 0.79             |
| 丙氨酸 ( Ala)  | 0.72                                  | 1.03             | 1.01             | 1.12             | 1.03             |
| 缬氨酸 ( Val)  | 0.91                                  | 1.22             | 1.38             | 1.45             | 1.40             |
| 蛋氨酸 ( Met)  | 0.23                                  | 0.28             | 0.29             | 0.29             | 0.28             |
| 异亮氨酸 ( Ile)   | 0.67                                  | 0.86             | 0.97             | 1.03             | 1.01             |
| 亮氨酸 ( Leu)  | 0.93                                  | 1.29             | 1.40             | 1.49             | 1.46             |
| 酪氨酸 ( Tyr)  | 0.38                                  | 0.54             | 0.55             | 0.61             | 0.54             |
| 苯丙氨酸 ( Phe)   | 0.65                                  | 0.88             | 0.86             | 0.94             | 0.94             |
| 赖氨酸 ( Lys)  | 0.45                                  | 0.66             | 0.81             | 0.90             | 0.71             |
| 组氨酸 ( His)  | 0.29                                  | 0.43             | 0.38             | 0.45             | 0.41             |
| 精氨酸 ( Arg)  | 0.63                                  | 0.93             | 0.88             | 1.08             | 0.85             |
| 总含量   | 10.92                                 | 15.33            | 17.29            | 18.19            | 16.34            |
| Total content   |                                       |                  |                  |                  |                  |

由表 3看出 ,盐胁迫培养基中愈伤组织的氨基酸含量都比较高 ,除含量 0.15% NaCl的培养基外 ,其他愈伤组织的氨基酸含量随 NaCl浓度的升高而增加 ,至 0.15% NaCl时 ,氨基酸含量开始下降 ,其变化如图 2

脯氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和精氨酸的含量变化与总氨基酸的变化不一致 ,其它氨基酸含量变化趋势与总氨基酸变化趋势一致

在 NaCl浓度为 0.07% 的培养基中 ,大豆愈伤组织的脯氨酸含量最高 ,为对照组的

2.72倍,然后随着 NaCl浓度的升高而降低,丙氨酸、组氨酸和精氨酸含量变化趋势一致,均在 0.1% NaCl浓度的培养基中积累的多,为对照的 1~2倍,从图 3看出,它们含量变化不如脯氨酸显著。

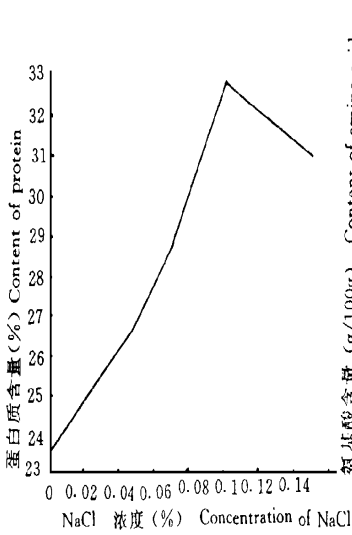


图 1 不同盐胁迫下大豆愈伤组织粗蛋白含量的变化

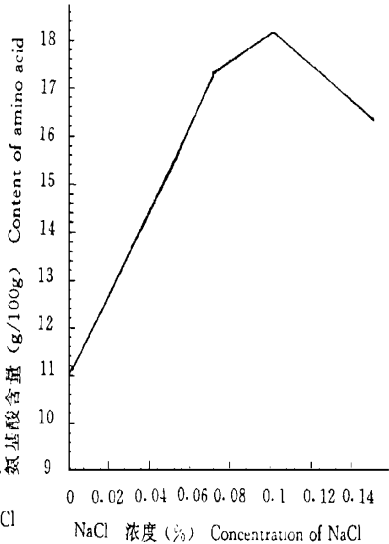


图 2 不同盐胁迫下大豆愈伤组织氨基酸含量变化

Fig. 1 Change of the content of protein of callus in soybean under different salt stress

Fig. 2 Changes of amino acid of soybean callus under different salt stress

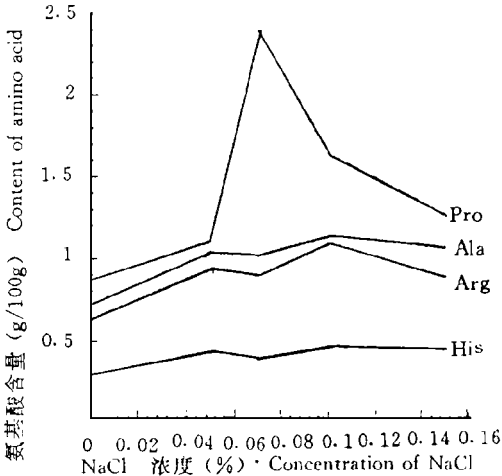


图 3 盐胁迫下几种氨基酸含量的变化

Fig. 3 Changes of contents of a few amino acids under different salt stress

(三)可溶性糖含量

盐胁迫下大豆愈伤组织的糖含量均低于对照,而 MS 培养基中大豆的愈伤组织糖含量较高。

表 4 盐胁迫对大豆愈伤组织可溶性糖含量的影响

Table 4 Effect of NaCl stress on contents of soluble sugar in soybean callus

|                            |                  |                  |                  |                  |                  |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| NaCl 浓度 ( % )              | 0. 0             | 0. 05            | 0. 07            | 0. 10            | 0. 15            |
| Concentration of NaCl( % ) | M S <sub>1</sub> | M S <sub>2</sub> | M S <sub>3</sub> | M S <sub>4</sub> | M S <sub>5</sub> |
| Content of soluble sugar   | 2. 84            | 2. 32            | 2. 52            | 2. 76            | 2. 14            |

讨 论

盐胁迫过程中,大豆愈伤组织的蛋白质、氨基酸和可溶性糖含量都有不同程度的变化。

研究表明,在一定的 NaCl 浓度范围内,大豆愈伤组织的蛋白质含量随 NaCl 浓度的升高而增加,而在 NaCl 浓度增至 0. 15% 时,蛋白质含量转而下降,此时大豆愈伤组织增殖很慢,颜色呈褐黄色,由此说明,0. 15% NaCl 浓度不利于大豆愈伤组织的生长。盐害是作物减产的最严重的逆境因子之一,Ratheri G. (1985)研究了盐害对大豆植株的生长、碳水化合物的浓度、降解酶、淀粉酶活性、碳酸化酶及转化酶的影响,结果发现高浓度的盐害对植物的生长有抑制作用<sup>[1]</sup>。又有研究指出<sup>[2]</sup>,大豆品种“晋豆 1 号”的愈伤组织在 0. 1~ 0. 35% NaCl 浓度范围内,随 NaCl 浓度的升高,蛋白质含量下降。这与本实验的在 0. 1~ 0. 15% NaCl 浓度下,大豆愈伤组织的蛋白质含量下降一致。从本研究的“小粒 1 号”与“晋豆 1 号”大豆愈伤组织生长适应的 NaCl 浓度范围差别可看出,不同的品种其耐盐的程度不同。据报道,不同的植物品种间存在着明显的耐盐差异,来源于盐碱地区、干旱地区的品种耐盐性较强<sup>[4]</sup>。

本研究中,大豆愈伤组织的氨基酸含量变化趋势与蛋白质含量变化趋势一致。氨基酸是活跃的蛋白质合成的氮源,游离氨基酸总量的变化,特别是各种氨基酸所占比例的变化,必然使蛋白质含量发生变化<sup>[5]</sup>。盐胁迫过程中,除脯氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和精氨酸外,其它组分氨基酸变化趋势与总氨基酸含量变化一致,即均在 0. 10% NaCl 培养基中积累最多。氨基酸各组分中,脯氨酸含量积累的最多,在 0. 07% NaCl 中为对照的 2. 72 倍,这说明脯氨酸的变化对植物的耐盐是有重要意义的。有学者认为氨基酸总量的增加主要是游离脯氨酸增多所致。但从本研究结果,脯氨酸含量的变化趋势并不与总氨基酸含量变化趋势一致,因此氨基酸总量的增加可能是由氨基酸各组分在盐胁迫下增加所致。一般认为,植物体内的游离脯氨酸作为植物的渗透剂,在植物对抗外界环境胁迫时起平衡细胞代谢作用,以保持细胞内环境的相对稳定。周荣仁等<sup>[3]</sup>筛选出耐 0. 5~ 2. 0% NaCl 烟草细胞系,其游离脯氨酸含量随盐浓度的提高而增加。陈云昭等<sup>[2]</sup>在含 0. 1~ 0. 4% NaCl 培养基中获得的大豆小真叶愈伤组织的脯氨酸含量也是随着 NaCl 浓度的升高而增加<sup>[2]</sup>,这说明脯氨酸积累可起渗透调节作用,细胞渗透调节越大,植物耐盐性越强,在本研究中也观察到盐胁迫中,在愈伤组织生长较旺盛的,脯氨酸含量也越高。大豆愈伤组织的蛋白质、氨基酸的变化是大豆顺逆境而产生的生理适应。

## 参 考 文 献

- [1] Rathen, G, J. of Plant Nutr. 1985, 8(3)  
[2] 陈云昭等, 1992, 在盐胁迫下获得的大豆愈伤组织及再生植株的生化反应, 大豆科学, (11): 70~ 73  
[3] 周荣仁等, 1989, 利用组织培养研究植物耐盐机理与筛选耐盐突变体的进展, 植物生理学通讯, (5): 11~ 19  
[4] 邵桂花等, 1993, 大豆耐盐性研究进展, 大豆科学, 12(3): 244~ 248  
[5] 张栋等, 1995, ABA, NAA诱导水稻胚性愈伤组织的研究, 实验生物学报, (28): 229~ 334

## EFFECT OF SALT STRESS ON SOYBEAN COTYLEDON CALLUS TISSUE DEVELOPMENT

Ma Shuying Yin Tanfu

*(University of Agricultural and Animal Science of PLA)*

Yuan Ying Liu Depu Liu Yanzhing

*(Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Science)*

### Abstract

The young cotyledon soybean callus tissues were cultured in the different concentration NaCl medium. For five generations, the contents of protein, amino and soluble sugar of soybean callus tissue were measured. The result showed that contents of protein and amino of callus tissue under salt stress were higher than those of control. Soluble sugar content was lower than that of control. Except in 0.15% NaCl, the contents of protein and amino were increased with increase of NaCl concentration. The accumulation of proline in 0.07% NaCl medium was 2.72 times higher than in control. The changes of proline, alanine, arginine and histidine were different from the change of total amino under salt stress.

**Key words** Salt stress; Protein; Amino acid; Soluble sugar; Soybean callus