

# 高温 渗透双重胁迫对大豆某些生理反应具累加效应的初报<sup>\*</sup>

韩永华<sup>\*\*</sup> 郑易之<sup>\*\*\*</sup> 李甜 高扬

(东北师范大学生命科学院, 长春 130024)

**摘要** 对“吉林 27 号”和“白农 6 号”大豆幼苗进行了单纯高温、渗透和高温与渗透双重处理。发现三种胁迫处理均导致两品种幼苗叶片相对含水量下降, 相对电导率和丙二醛 (MDA) 含量升高。高温渗透双重胁迫对含水量影响、对质膜透性和膜脂过氧化损伤近似于两单项胁迫效应之和。此外, 胁迫作用可诱导两品种超氧化物歧化酶 (SOD) 活性升高, 使“白农 6 号”过氧化氢酶 (CAT) 活性上升。胁迫处理使“吉林 27 号”CAT 活性降低。

**关键词** 高温; 渗透胁迫; 双重胁迫; 抗氧化保护酶; 大豆

**中图分类号** S565.01 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)01-0041-04

植物在生长过程中, 时常受到自然环境中多种逆境的影响。近年来, 关于逆境胁迫因子 (高温、低温、干旱、冷害、冻害等) 影响植物正常代谢, 破坏生物大分子的细胞结构和功能, 致使细胞及整个植株受到伤害的研究已有大量报道<sup>[1,2]</sup>。然而, 双重胁迫对植物生理生化影响的研究并不多见。

本文研究了高温和渗透双重胁迫下大豆生理生化反应的变化, 并将其与单纯干旱、单纯高温处理下的相应变化进行比较, 初步探讨双重逆境胁迫对大豆生理反应的影响和膜系统的伤害。研究结果可为农业生产中的抗逆育种提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

供试大豆品种为“吉林 27 号”和“白农 6 号”。种子分别由吉林省农业科学院大豆研究所和吉林省白城农科所提供。

### 1.2 幼苗的培养及胁迫处理

将精选的大豆种子用 10% 甲醛消毒 10 分钟, 自来水冲洗后用蒸馏水浸泡 24 小时, 然后放入 25℃ 的恒温箱中催芽。在 25/18℃, 12000LX 光强的

光照培养室内用 Hoagland 营养液中培养至第一片三出复叶完全展开。选用大小一致的幼苗叶片。进行以下胁迫处理 (表 1)。

表 1 大豆幼苗经以下几种胁迫条件处理

Table 1 Soybean seedlings under stress treatments

对照组 (CK) Control (CK)
处理组 T1 45℃ 高温, 2h Treatment T1 45℃ high temperature for 2 hours
处理组 T2 用 6% 聚乙二醇 (PEG6000) 进行根际模拟干旱胁迫处理一周 Treatment T2 6% PEG treatment for 1 week
处理组 T3 (T1+ T2): 用 6% PEG 进行根际模拟干旱胁迫一周处理后经 45℃ 高温处理 2 小时 Treatment T3 (T1+ T2): high temperature after PEG treatment for 1 week

### 1.3 测定项目及方法

#### 1.3.1 叶片相对含水量的测定

按张志良 (1990) 的方法测定。即采用常规饱和、烘干、称重的方法。计算公式为:

$$\text{相对含水量} = (W_f - W_d) / (W_t - W_d) \times 100\%$$

( $W_f$  组织鲜重;  $W_d$  组织干重;  $W_t$  饱和鲜重)<sup>[3]</sup>。

#### 1.3.2 电导率的测定

采用电导法<sup>[4]</sup>。将冲洗后的叶片剪成 0.5cm<sup>2</sup> 的小片。称 1g 样品放入试管中, 加重蒸水 15ml, 真空

\* 收稿日期: 2000-02-29

\*\* 现在广西师范大学生物系工作

\*\*\* 为通讯作者

基金项目: 吉林省科委 (963050) 和国家留学基金委员会资助项目

作者简介: 韩永华 (1976-), 女, 硕士, 现在武汉大学生命科学院读博士学位, 研究方向, 植物抗逆分子生物学。

渗入 5min, 静置半小时。在室温下用 DDS-11A 型电导仪测定其电导率。然后再将此样品管置于沸水浴中 5min 冷却至室温后, 再测其总电导率。以电导率与总电导率的比值作为相对电导率, 表示该样品的电解质渗透率。

### 1.3.3 丙二醛 (MDA) 的提取与测定

参照林植芳等 (1988) 的方法<sup>[5]</sup>。称取叶片, 加入适量的 0.05M 磷酸钠缓冲液 (pH7.8), 研磨。匀浆液经离心 (4℃, 1500g, 20分钟)。吸取 1.5ml 上清液, 加入 2.5ml 含 5% 硫代巴比妥酸的 5% 三氯乙酸溶液, 于沸水浴中加热 10min。立即将其置于冰浴中冷却, 再离心。取上清液在 732 型分光光度计上于波长 534nm 和 600nm 下测定光密度。按 (OD<sub>532</sub> - OD<sub>600</sub>) 为特异吸收值, 以 E = 155/mol cm 计算 MDA 含量。单位为 nmol/g° FW。

### 1.3.4 超氧化物歧化酶 (SOD) 的提取及其酶活性的测定

酶的提取: 称取 1g 去脉叶片, 加入 2ml 0.05M 磷酸缓冲液 (含 1% PVP, 2mM EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 7.8), 匀浆 (4℃)。匀浆液离心后, 上清液用于酶活性的测定。

SOD 活性测定根据 SOD 抑制 NBT 光化还原的原理, 按王爱国等 (1983) 的方法测定 SOD 活性<sup>[6]</sup>。在 3ml 的反应液 (0.05M pH7.8 的磷酸钠缓冲液中含 1.3<sup>μ</sup>mol/L 核黄素, 13mmol/L 甲硫氨酸, 63<sup>μ</sup>mol/L NBT) 中, 加入适量酶液, 经 4000LX 光照 15min, 于 723 型分光光度计上测定其在 560nm 处的光密度值。以抑制 NBT 50% 的酶用量为一个酶活单位 (单位: unit mg<sup>-1</sup> protein)。

### 1.3.5 过氧化氢酶 (CAT) 的提取及其酶活性的测定

CAT 酶的提取方法同 SOD。CAT 活性测定按汪宗立等 (1988) 的方法<sup>[7]</sup>。3ml 反应液中含 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50mM 磷酸缓冲液, pH7.0, 0.5<sup>μ</sup>l 酶液启动反应, 用紫外分光光度计记录 240nm 处光密度变化, 以光密度改变 0.01 为一个酶活单位。单位: unit° min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein。

## 2 结果

### 2.1 高温、渗透胁迫对大豆叶片相对含水量、电解质渗透率和 MDA 含量的影响

高温、渗透胁迫均使大豆叶片相对含水量下降 (表 2) 叶片相对含水量反映植物体的水分状况, 是植物水分胁迫的指标之一。按照 Hsiao (1973) 所定义 RWC 降低 8-10%, 10-20% 及 20% 以上分别为轻度、中度和严重胁迫的参考标准<sup>[8]</sup>。从表 2 可见, 本实验所采用的三组胁迫程度顺序为 T3 > T2 > T1。

高温、渗透胁迫可导致大豆叶片相对电导率升高, 升高状况为 T3 > T2 > T1 (表 3)。相对电导率升高表明受胁迫叶片细胞内电解质外渗和细胞膜相对透性增加<sup>[9]</sup>。因此, 表 2 中数值及变化趋势反映出受胁迫叶片细胞膜受伤程度大小。

表 2 高温、渗透胁迫处理对大豆叶片相对含水量 (RWC, %) 的影响\*

Table 2 Effect of stress treatments in relative water content (%) of soybean leaves

处理条件 Stress	吉林 27号 Jilin 27		白农 6号 Bainong 6	
	EWC (%)	±% of control	EWC (%)	±% of control
CK	85.32		63.98	
T1(45°C, 2h)	63.01	-26.15	55.60	-13.09
T2(6% PEG)	58.49	-31.45	50.77	-20.65
T3(6% PEG+ 45°C, 2h)	39.23	-54.02	40.61	-46.53

\* 所有表中每一数值为三次测定的平均值。

表 3 高温、渗透胁迫处理对大豆叶片电解质渗透率 (%) 的影响

Table 3 Effect of stress treatments on leakage of electrolytes (%) of soybean leaves

处理条件 Stress	吉林 27号 Jilin 27		白农 6号 Binong 6	
	Leakage of electrolytes (%)	% of control	Leakage of electrolytes (%)	% of control
CK	9.4		9.11	
T1(45°C, 2h)	21.23	+125.85	10.81	+18.66
T2(6% PEG)	23.38	+148.72	12.39	+36.00
T3(6% PEG+ 45°C, 2h)	34.79	+270.11	14.71	+61.47

同样, 高温、渗透胁迫致使大豆叶片中 MDA 水平的升高, 升高状况同样为 T3 > T2 > T1 (表 4), 与相应的叶片受胁迫程度 (表 2) 和电解质渗透率 (表 3) 变化趋势一致。我们还对两品种在胁迫下的 MDA 含量与电解质渗透率相关性进行分析。结果显示, “吉林 27号” 两指标相关系数 r = 0.9906<sup>\*\*</sup>, 达极显著水平。“白农 6号” 两指标相关系数 r = 0.9695<sup>\*</sup>, 为显著相关, MDA 是膜脂过氧化的产物,

MDA水平反映了膜脂的过氧化损伤程度<sup>[9]</sup>。这意味着大豆叶片细胞的膜脂过氧化损伤是造成质膜透性增大和电解质渗漏的重要原因。

对比表 2 表 3和表 4中单一胁迫与双重胁迫下相对含水量、相对电导率以及 MDA变化特点,可以看出 T3增加的百分率近似为 T1和 T2相应值之和。我们认为, T2组(6% PEG)处理对植物细胞造成伤害大于 T1组(45°C, 2h)处理, T3组双重胁迫对叶片造成的伤害效应为两单一胁迫效应的叠加。

表 4 高温、渗透胁迫处理对大豆

叶片 MDA含量的影响(nmol/g° FW)

Table 4 Effect of stress treatments on MDA content (nmol/g° FW) of soybean leaves

处理条件 Stress	吉林 27 Jilin 27		白农 6号 Bainong 6	
	MDA content	Control	MDA content	Control
CK	30.3		25.7	
T1(45°C, 2h)	58.2	+ 92.08	38.1	+ 48.25
T2(6% PEG)	74.2	+ 145.87	43.1	+ 67.70
T3(6% PEG+ 45°C, 2h)	108.2	+ 257.09	49.8	+ 93.77

## 2.2 高温、渗透胁迫对大豆幼苗叶片 SOD和 CAT酶活性的影响

在高温、渗透胁迫下,两大豆品种 SOD酶活性升高,高于相应对照值,显示出 T2> T3> T1的变化趋势(表 5)。推测一定程度的胁迫处理可诱导 SOD酶活性,严重胁迫将抑制酶活性。

表 5 高温、渗透胁迫处理对大豆

叶片 SOD活性的影响(unit° mg<sup>-1</sup> protein)

Table 5 Effect of stress treatments on SOD activity (unit° mg<sup>-1</sup> protein) of soybean leaves

处理条件 Stress	吉林 27 Jilin 27		白农 6号 Bainong 6	
	SOD activity	Control(%)	SOD activity	Control(%)
CK	211.23		211.17	
T1(45°C, 2h)	231.15	+ 9.4	332.28	+ 50.2
T2(6% PEG)	297.05	+ 40.6	359.92	+ 62.7
T3(6% PEG+ 45°C, 2h)	254.77	+ 20.6	349.05	+ 57.8

从表 6可以看出,“白农 6号”CAT酶活约为 523.4。胁迫处理下,CAT酶活性比对照值升高,酶的变化趋势与 SOD酶相似,同样显示出 T2> T3> T1的趋势。而“吉林 27”CAT活性在对照组中很高,几乎为“白农 6号”对照组的二倍。三种胁迫处理导致“吉林 27”CAT酶活性大幅度下降,出现 T1> T2> T3的趋势。T3组中,CAT活性仅为对照

值的 50%。

表 6 高温、渗透胁迫处理对大豆

叶片 CAT活性的影响(unit° mg<sup>-1</sup> protein)

Table 6 Effect of stress treatments on CAT activity (unit° mg<sup>-1</sup> protein) of soybean leaves

处理条件 Stress	吉林 27 Jilin 27		白农 6号 Baiong 6	
	CAT activity	control (%)	CAT activity	control (%)
CK	1096.8		523.4	
T1(45°C, 2h)	1017.5	- 7.0	678.5	+ 29.6
T2(6% PEG)	831.8	- 24.2	883.2	+ 68.7
T3(6% PEG+ 45°C, 2h)	531.8	- 51.5	593.4	+ 13.4

## 3 讨论

关于逆境胁迫因子(高温、低温、干旱、冷害、冻害等)影响植物正常代谢过程,破坏生物大分子和细胞结构的功能,致使细胞及整个植株受到伤害的研究已有大量报道<sup>[1,2]</sup>。双重胁迫(或复合逆境)对植物生理生化影响的研究并不多见。然而,植物在生长、发育过程中所受到的胁迫常常是多方面的。通过对几种胁迫下植物生理生化指标的分析,我们首次报道与单一胁迫相比,双重胁迫在致使叶片细胞含水量降低,引起电解质外透率升高以及膜脂过氧化损伤方面具累加效应。因此我们推测,农作物在生长过程中受多种胁迫的损伤应比单一逆境要大得多。

细胞内丙二醛是植物膜脂过氧化作用的降解产物。可致使细胞内大分子及相应的细胞膜结构受到损伤。MDA含量常用来表示植物氧伤害的指标<sup>[9]</sup>。细胞活性氧清除系统包括酶促(SOD和CAT)和非酶促活性氧清除剂<sup>[10]</sup>。它们可减轻和消除由胁迫引起的活性氧代谢失调对植物造成的伤害。本实验检测的五项指标中有三项(如细胞相对含水量,电解质渗透率和丙二醛水平)均呈现出双重胁迫的累加效应,且丙二醛含量与电解质渗透率呈显著或极显著正相关。这暗示植物的氧伤害和膜脂过氧化作用可能是造成细胞电解质漏失以及含水量降低的主要原因之一。本文结果中显示的植株 SOD和 CAT酶活性(除“吉林 27”CAT外)与丙二醛含量间似乎未见规律性的变化。我们推测,参与氧自由基对膜脂过氧化损伤及修复过程的因素可能有很多。关于 SOD和 CAT酶在减轻大豆植株氧伤害和对大豆叶片的保护作用大小有待进一步研究。

根据两大豆品种五项生理指标的对比分析可知,“白农 6号”抗干旱和高温能力大于“吉林 27”,其中二者叶片电解质渗透率和 MDA含量的差异尤为明显。表明这两个生理指标对干旱、高温胁迫较为敏感。我们认为,可以胁迫下叶片电解质渗透率和 MDA含量升高(或降低)幅度作为评价大豆品种抗旱、耐高温能力的重要参考指标。

## 参 考 文 献

- 1 苏维埃,植物对温度逆境的适应,植物生理与分子生物学,[M]北京:科学出版社,1999,721-738
- 2 汤章城,对渗透和淹水胁迫的适应机理,[M]植物生理与分子生物学,北京,科学出版社,1999,739-751
- 3 王邵唐,植物生理学实验指导,[M]西安,陕西科学技术出版社,1987,1-2
- 4 李锦树,王洪春等,干旱对玉米叶片细胞透性及膜脂的影响,[J]植物生理学报,1983,(3):223-228
- 5 林植芳等,衰老叶片和叶绿体中  $H_2O_2$  的累积与膜脂过氧化的关系,[J]植物生理学报,1988,(14):16-22
- 6 王爱国,罗广华,邵从本等,大豆种子超氧化物歧化酶的研究,[J]植物生理学报,1983,(1):77-84
- 7 汪宗立,刘晓忠等,玉米的渗透伤害与膜脂过氧化作用和保护酶活性的关系,[J]江苏农业学报,1988,(4):1-8
- 8 Hsiao, T C. Plant responses to water stress. [J] Ann. Rev. Plant Physiol, 1973,(24):519-570
- 9 蒋明义,杨文英,徐江等,渗透胁迫诱导水稻幼苗的氧化伤害,[J]作物学报,1994,20(6):733-738
- 10 王爱国,植物的氧化代谢,[M]植物生理与分子生物学,北京,科学出版社,1996,366-389

## EFFECT OF HIGH TEMPERATURE OR/AND OSMOTIC STRESS ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS IN SEEDLING OF TWO SOYBEAN CULTIVARS

Han Yonghua Zheng Yizhi Li Yian Gao Yang

(School of life Sciences, Northeast Normal University 130024)

**Abstract** The seedlings of two soybean cultivars "Jilin 27" and "Bainong 6" were exposed to high temperature or/and osmotic conditions. Under stresses, the relative water content (%) of the stressed leaves decreased. The leakage of electrolytes (%) and MDA content of the stressed leaves increased. Effect of double stresses of high temperature and osmotic stress on soybean leaves was approximately the sum of that under two single stresses. In addition, SOD activities of "Bainong 6", and CAT activities of "Jilin 27" increased under stress conditions. But CAT activities of "Jilin 27" declines.

**Key words** High temperatuer; Osmotic stress; Double stresses; Anti-oxidant enzymes; Soybean