

低温胁迫对大豆萌发期生理指标的影响

张大伟^{1,2}, 杜翔宇^{1,2}, 刘春燕², 单大鹏³, 吴 铮⁴, 陈庆山¹, 胡国华^{1,2}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 黑龙江省农业科学院 绥化分院, 黑龙江 绥化 152052; 4. 黑龙江省巴彦县广播电视局, 黑龙江 巴彦 151800)

摘 要:在 4℃ 和 20℃ 条件下, 对 12 个大豆品种萌发期的相对电导率、丙二醛、脯氨酸和可溶性糖等生理指标进行测定, 并对其萌发期耐低温性进行综合性评价。结果表明: 随着 4℃ 处理时间的延长, 电导率、丙二醛、脯氨酸和可溶性糖的含量都升高; 4℃ 与 20℃ 电导率的差值略有升高, 其它都降低; 只有相对电导率差值的均值变化趋势与 4℃ 变化动态一致。按照上述指标将供试品种萌发期的耐低温性分为 3 类: 绥农 14、垦丰 7 号、黑农 48、合丰 25 和垦农 18 的耐低温性强, 红丰 11、铁 6915 和辽豆 21 耐低温性次之, 垦鉴豆 35、海南 2 号、合丰 50 和 NOVA 耐低温性差。结果为进一步完善防御大豆低温冷害措施和进行耐低温性生理生化育种提供理论依据。

关键词:大豆; 低温胁迫; 生理指标; 综合性评价

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0228-05

Effect of Low-temperature Stress on Physiological Indexes of Soybean at Germination Stage

ZHANG Da-wei^{1,2}, DU Xiang-yu^{1,2}, LIU Chun-yan², SHAN Da-peng³, WU Zheng⁴, CHEN Qing-shan¹, HU Guo-hua^{1,2}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090; 3. Suihua Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Suihua 152052; 4. Radio and Television Bureau of Bayan, Bayan 151800, Heilongjiang, China)

Abstract: Soybean is sensitive to low temperature, especially in initial period of germination. Relative conductivity, malondialdehyde (MDA), proline, and soluble sugar of twelve soybean varieties at stage of germination were measured in 4℃ and 20℃. The comprehensive evaluation and cluster analysis were conducted for them. The results show that relative conductivity, MDA, proline, and soluble sugar increased with the time at 4℃, difference value between 4℃ and 20℃ in soluble sugar is increased slightly and the others are decreased, mean trend of difference value in relative conductivity is consistent with change dynamics at 4℃. The most tolerance varieties are Suinong 14, Kenfeng 7, Heinong 48, Hefeng 25, and Kennong 18. On the contrary, Kenjiandou 35, Hainan 2, Hefeng 50, and NOVA are the least. It is provided a theoretical basis for protecting of chilling damage and breeding varieties with low temperature tolerance.

Key words: Soybean; Low-temperature; Physiological indexes; Comprehensive evaluation

温度对植物的生长发育有重要影响, 低温不仅影响大豆等作物的产量, 而且极大地限制了这些作物的分布与应用。在大豆的各个生育阶段都易出现冷害, 进而降低大豆的产量和品质, 大豆在萌发初期对低温尤为敏感。宋剑陶等对大豆抗冷性生理生化指标进行筛选, 指出抗冷性越强的品种, SOD 酶活性越高, MDA 含量越低, 且低温导致 MDA 含量的增加幅度也越小^[1]。郝晶等指出耐冷大豆品种在萌发期间的 SOD、POD、CAT 活性对低温反应灵敏, 低温处理后 SOD、POD、CAT 活性较高或较稳

定^[2]。该文选用 12 个大豆品种在萌发期分别进行 4℃ 和 20℃ 处理, 探讨植物体内脯氨酸、可溶性糖、丙二醛含量及相对电导率的变化规律与抗冷害的关系, 明确抗冷性的生理生化机制, 并进行隶属函数及聚类分析, 为研究防御大豆低温冷害措施和进行抗冷性生理生化育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

红丰 11, 铁 6915, NOVA, 合丰 25, 海南 2 号, 黑

收稿日期: 2009-11-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2006AA100104-3); 引进国际先进农业科学技术计划资助项目 (2006-G1(A)); 国家支撑计划资助项目 (2006BAD21B01); 国家转基因专项资助项目 (2009ZX08004-009B)。

第一作者简介: 张大伟 (1984-), 男, 硕士, 研究方向为大豆耐低温机制。Email: zhangdaweiku1189@163.com。

通讯作者: 陈庆山, 教授。E-mail: qshchen@126.com; 胡国华, 研究员。E-mail: hugh757@vip.163.com。

农 48, 辽豆 21, 垦丰 7 号, 绥农 14, 合丰 50, 垦农 18 和 垦鉴豆 35。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 取 12 个大豆品种各 60 粒, 每个品种分放在 2 个培养皿中在 20℃ 条件下萌发 1 d, 然后一部分置于 4℃ 条件下, 另一部分置于 20℃ 条件下, 连续处理 9 d, 每天取样进行生理指标测定。以 20℃ 处理为对照, 4℃ 为低温处理^[3]。

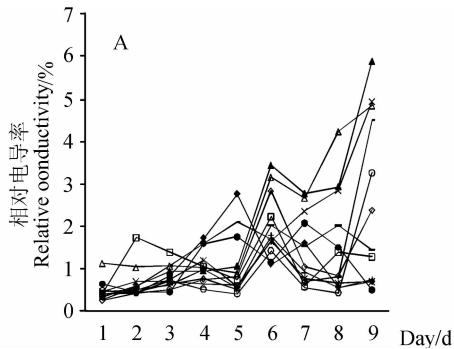
1.2.2 生理指标测定 参考郝再彬等^[4]的方法测定丙二醛含量, 可溶性糖含量, 脯氨酸含量和电导率。

1.2.2 数据分析 用 Excel 2007、DPS 统计分析软件进行隶属函数、聚类分析。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对大豆耐低温性的影响

2.1.1 相对电导率 由图 1 可知, 在 20℃ 条件下,



12 个大豆品种的相对电导率随萌发天数的延长呈逐步上升趋势。在 4℃ 处理下, 12 个大豆品种的相对电导率呈现单峰曲线, 前 4 d 逐步上升, 在第 4 天达到峰值, 之后下降。在 20℃ 时大豆品种逐步吸水膨胀, 并由于种子萌发生长需要, 通过质膜和外界进行离子交换, 导致质膜的通透性增加, 因此相对电导率值增加。在 4℃ 时, 受低温胁迫作用, 前期种子质膜透性增加, 稳定性降低, 使相对电导率增加^[5-7]。后期由于温度没有达到冰点温度, 未能真正对种子造成伤害, 因此种子代谢减慢, 生理活性降低, 相对电导率下降。对 4℃ 与 20℃ 电导率进行差值分析得到, 12 个品种中的 11 个在萌发第 3 或第 4 天相对电导率达到峰值, 唯有国外品种 NOVA 在后期才达到峰值, 这可能与基因型有关。从平均值上(表 1)与 4℃ 电导率变化动态上看, 相对电导率差值变化趋势与 4℃ 处理趋势一致。

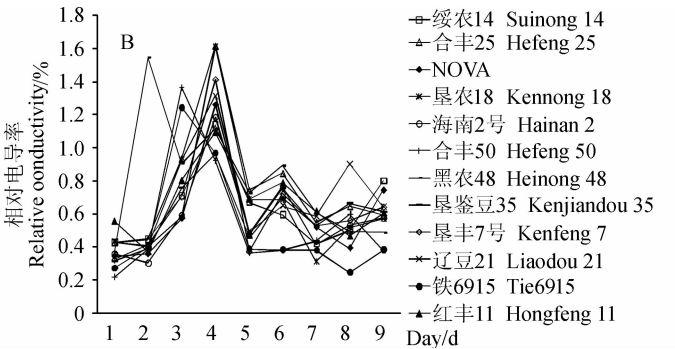


图 1 大豆在 20℃ 和 4℃ 条件下相对电导率变化动态
Fig.1 Change dynamics of relative conductivity of soybean varieties at 20℃ (A) and 4℃ (B) for 9 days

表 1 大豆品种 4℃ 与 20℃ 生理指标差值的均值变化趋势

生理指标	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天
Physiological Index	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
电导率 RC	-0.12	-0.18	0.02	0.14	-0.53	-1.35	-0.99	-1.03	-2.03
丙二醛 MDA	0.33	0.05	0.40	-0.04	0.62	1.04	-0.19	0.69	0.81
脯氨酸 Proline	-1.29	-1.62	-1.57	-0.30	1.35	-3.67	-1.24	-3.86	-3.65
可溶性糖 SS	0.01	0.39	0.68	0.06	1.49	2.35	0.63	1.73	1.85

RC: relative conductivity; MDA: malondialdehyde; SS: Soluble sugar

2.1.2 丙二醛含量 由图 2 可知, 在 20℃ 条件下, 12 个大豆品种的丙二醛含量随萌发天数的延长大体上呈逐步下降趋势; 在 4℃ 条件下, 多数大豆品种丙二醛含量变化幅度略有上升。种子在低温胁迫下, 随着处理时间的延长, 种子细胞内产生了活性氧, 进而引发质膜的过氧化反应, 对质膜产生了一定程度的伤害和功能的破坏; 活性氧及其引起的质膜过氧化反应是种子活力降低的主要原因之一^[8]; 丙二醛(MDA)作为膜脂过氧化物的最终产物之一, 其含量的多少代表着细胞膜被破坏程度的大小^[9]。在 20℃ 条件下, 大豆种子逐步吸水膨胀, 种子萌发,

使一些能抑制活性氧产生的物质增加, 如超氧化物歧化酶(SOD)等, 导致大部分品种丙二醛含量的降低; 在 4℃ 条件下, 种子代谢缓慢, 活性低, 导致活性氧含量增加。由于温度没有达到致死温度, 种子体内会产生一些抑制活性氧的物质, 调节活性氧的含量。又因为处理期间, 丙二醛含量变化幅度较小, 所以 4℃ 对种子质膜的伤害程度不大。对 4℃ 处理与 20℃ 对照丙二醛含量进行差值分析得到, 12 个品种丙二醛含量变化幅度较小。从平均值上看(表 1), 丙二醛含量变化趋势与 4℃ 处理趋势不完全一致, 可能是生育期的不同导致的。

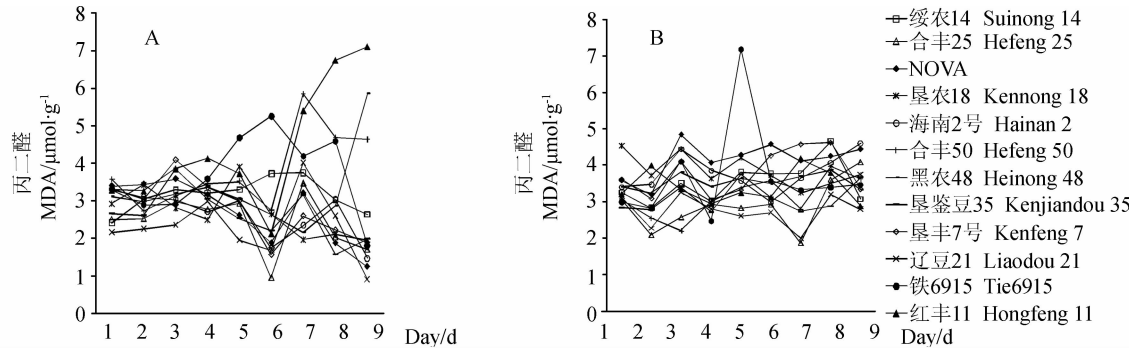


图2 大豆在 20℃ 和 4℃ 条件下品种丙二醛含量变化动态

Fig.2 Change dynamics of MDA of 12 varieties soybean at 20℃ (A) and 4℃ (B) for 9 days

2.1.3 脯氨酸含量 植物在低温胁迫条件下,随着时间的延长,脯氨酸含量增加。由图 3 可知,在 20℃ 条件下,多数大豆品种脯氨酸含量变化表现上升趋势,在第 8 天达到最大值,然后降低;在 4℃ 条件下,大豆品种脯氨酸含量的变化表现上升趋势,在第 8 天脯氨酸含量达到最大值,然后降低。在 20℃ 时大豆种子逐步吸水膨胀,并由于种子萌发生长,使脯氨酸含量得到积累;后期下降,是脯氨酸调

节渗透压^[10],提供萌发生长所需要的营养及能量^[11],清除自由基^[12]等原因所造成的。在 4℃ 时低温胁迫导致脯氨酸含量升高。由于抵御低温胁迫,脯氨酸会抑制自由基大量产生,保护细胞结构,所以其含量升高的幅度不大,导致 4℃ 处理与 20℃ 对照脯氨酸含量差值的动态变化数值降低。从平均值上看(表 1),在第 4 天达到峰值,但是随着脯氨酸的消耗,后期呈下降趋势。

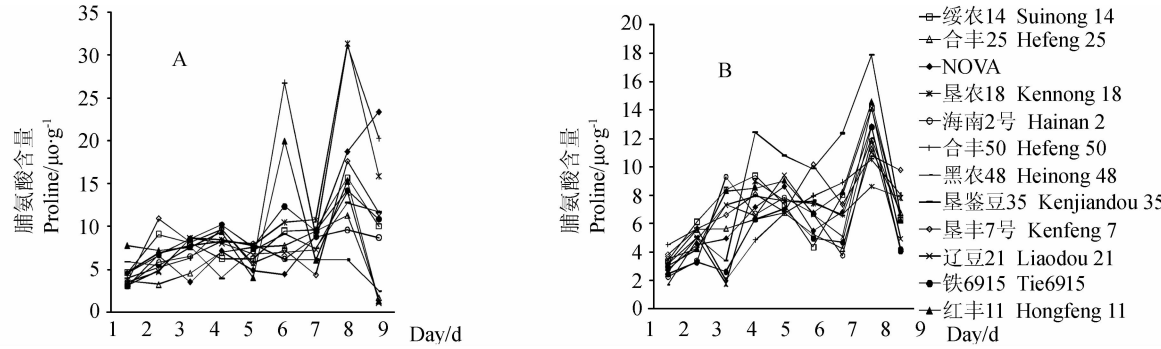


图3 大豆品种在 20℃ 和 4℃ 条件下脯氨酸含量变化动态

Fig.3 Change dynamics of proline of 12 varieties soybean at 20℃ (A) and 4℃ (B) for 9days

2.1.4 可溶性糖含量 在 20℃ 条件下,12 个大豆品种可溶性糖含量大体上呈下降趋势,在第 6 天达

到最低值;在 4℃ 条件下,多数大豆品种可溶性糖含量大体上呈上升趋势,但变化幅度较小(图 4)。在

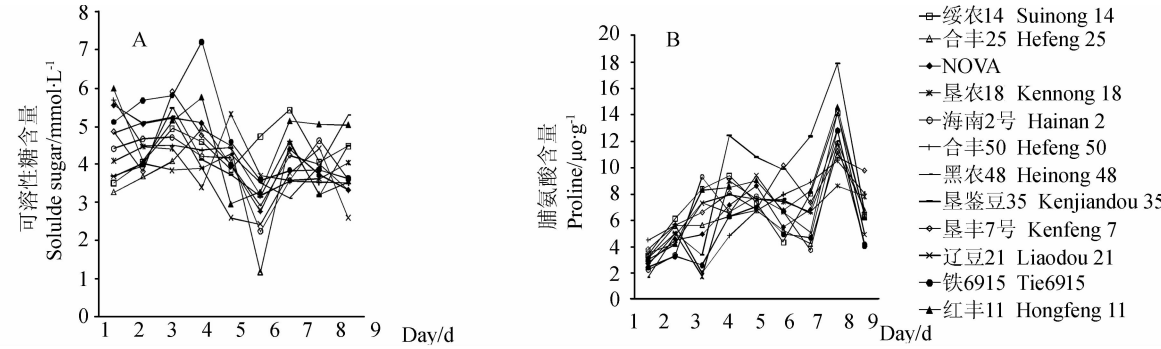


图4 大豆品种在 20℃ (A) 和 4℃ (B) 条件下可溶性糖含量变化动态

Fig.4 Change dynamics of soluble sugar of 12 varieties soybean at 20℃ (A) and 4℃ (B) for 9 days

20℃ 时随着种子吸水膨胀,种子萌发,积累了一定的可溶性糖;在第 5 或第 6 天,可溶性糖维持种子的渗透势^[13]及提供生长需要,导致其含量降低,后期随着萌发天数的延长,种子活性的增加,可溶性糖

含量有所升高。很多研究指出,植物在低温胁迫下,可溶性糖含量增加。在 4℃ 时,可溶性糖含量有所积累,但其变化幅度不一。对 4℃ 处理与 20℃ 对照可溶性糖含量进行差值分析得到,12 个品种可溶

性糖含量变化幅度略有升高。从平均值上看(表 1),可溶性糖含量差值变化趋势与 4℃处理趋势不完全一致,可能是生育期的不同导致的^[14]。

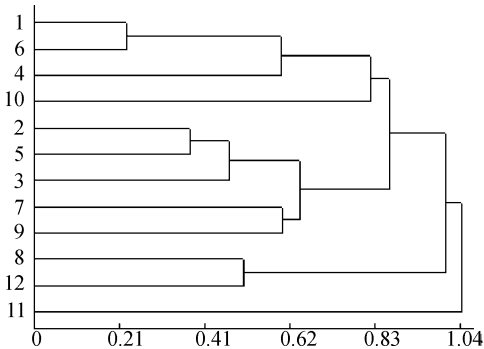
2.2 低温胁迫下大豆耐低温性的综合分析

通过对生理指标进行隶属函数值评价分析(表 2),可以得到耐低温性由强到弱的顺序:绥农 14 > 垦丰 7 号 > 黑农 48 > 合丰 25 > 垦农 18 > 红丰 11 >

铁 6915 > 辽豆 21 > 垦鉴豆 35 > 海南 2 号 > 合丰 50 > NOVA。对平均隶属值进行系统聚类分析(图 5),可将其分为 3 类:绥农 14、垦丰 7 号、黑农 48、合丰 25 和垦农 18 的耐低温性强,红丰 11、铁 6915 和辽豆 21 耐低温性次之,垦鉴豆 35、海南 2 号、合丰 50 和 NOVA 耐低温性差。

表 2 大豆品种萌发期耐低温生理指标隶属函数值评价

品种 Varieties	电导率 Relative conductivity	丙二醛 MDA	脯氨酸 Proline	可溶性糖 Soluble sugar	总隶属函数值 Subordinate function value	位次 Order
海南 2 号 Hainan 2	0.69	0.50	0.28	0.43	1.91	10
绥农 14 Suinong 14	0.7	0.62	0.53	0.46	2.32	1
合丰 25 Hefeng 25	0.72	0.54	0.63	0.35	2.23	4
NOVA	0.72	0.42	0.41	0.33	1.88	12
垦农 18 Kennong 18	0.74	0.52	0.51	0.45	2.22	5
合丰 50 Hefeng 50	0.70	0.48	0.32	0.40	1.90	11
黑农 48 Heinong 48	0.64	0.51	0.55	0.54	2.24	3
垦鉴豆 35 Kenjiandou 35	0.56	0.63	0.40	0.40	1.99	9
垦丰 7 号 Kenfeng 7	0.72	0.53	0.40	0.60	2.25	2
辽豆 21 Liaodou 21	0.67	0.40	0.36	0.66	2.10	8
铁 6915 Tie 6915	0.73	0.74	0.36	0.30	2.12	7
红丰 11 Hongfeng 11	0.59	0.59	0.38	0.56	2.13	6



1. 海南 2 号,2. 绥农 14,3. 合丰 25,4. NOVA,5. 垦农 18,6. 合丰 50,7. 黑农 48,8. 垦鉴豆 35,9. 垦丰 7 号,10. 辽豆 21,11. 铁 6915,12. 红丰 11

1. Hainan 2, 2. Suinong 14, 3. Hefeng 25, 4. Kennong 18,5. Hefeng 50, 6. Heinong 48,7. Kenjiandou 35, 8. Kenfeng 7, 9. Liaodou 21, 10. Tie 6915, 12. Hongfeng 11

图 5 大豆品种萌发期耐低温性聚类分析图

Fig. 5 Diagram of cluster analysis of low-temperature tolerance for 12 varieties soybean at stage of germination

3 讨论

3.1 低温胁迫对电导率的影响

种子吸胀冷害的原初作用位点在生物膜上^[15]。Lyons 认为,这是由于低温导致细胞膜相变,质膜由液晶态变成凝胶态,从而增大了细胞膜的透性造成

的^[16]。低温胁迫研究中,在很多作物上都得到了电导率可以作为耐低温能力鉴定指标的结论,并认为品种的耐低温性与电解质渗出率呈负相关,但这种结论是在极端低温的条件下得出的。在 4℃条件下对萌发的大豆种子进行低温处理,其相对电导率随着低温处理时间的延长而呈缓慢增大的趋势,但与对照相比相对电导率低,与宰学明等的研究结果一致^[17]。

3.2 低温胁迫对丙二醛的影响

MDA 是膜脂过氧化作用的主要产物之一,具有很强的细胞毒性,对膜和细胞中的许多生物功能分子如蛋白质、核酸和酶等均有很强的破坏作用,并参与破坏生物膜的结构与功能。MDA 含量高低是反映膜脂过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标^[18]。在 20℃条件下,丙二醛含量变化大体上呈缓慢的下降趋势;4℃条件下,呈缓慢上升趋势,与对照相比各大豆品种表现不一。这可能是由于种子体内清除活性氧物质的积累程度不同所致。

3.3 低温胁迫对脯氨酸的影响

游离脯氨酸能促进蛋白质水合作用,防止蛋白质脱水变性,因此在植物处于低温胁迫时游离脯氨酸的积累被认为是对低温胁迫的一种适应性反应。12 个大豆品种在低温萌发下,游离脯氨酸含量都有

一定的积累,并随低温处理时间的延长,游离脯氨酸含量逐渐增加,这表明植物体内游离脯氨酸在植物遭受低温胁迫时起到渗透调节的作用,保持细胞内环境的相对稳定。不同品种的脯氨酸含量有差异。一般来说,耐低温能力越强的品种,脯氨酸积累的越多。游离脯氨酸的变化随着材料的不同和生育期的不同而有很大的差异^[13]。

3.4 大豆耐低温性的综合分析

植物的耐低温性是由多种因素共同作用的一个较为复杂的综合性状。目前应用最为普遍的抗逆性综合评价方法是隶属函数法和聚类方法。隶属函数分析是在多项指标测定基础上进一步对植物品种抗逆性进行综合评价,可以大大提高耐低温筛选的可靠性。聚类分析是研究(样品或指标)分类问题的一种统计分析方法。根据隶属函数和聚类分析原理,可以建立一个在抗逆环境中,对多项指标进行综合评价,筛选抗逆品种的方法。通过对12种大豆品种的隶属函数值及聚类分析进行综合性评价,将它们分为3类,为进一步的完善大豆耐低温机理的研究提供了依据。

4 结论

对12个大豆品种进行萌发期的电导率、丙二醛、脯氨酸和可溶性糖等生理指标的测定与分析。由于4℃没有达到致死温度,对种子不是严重伤害,所以其结果与许多研究不尽相同,而且单一的指标并不能区分品种间的抗逆性,因此通过隶属函数和聚类分析,对其进行耐低温性综合分析,将其分为3类:绥农14、垦丰7号、黑农48、合丰25和垦农18的耐低温性强,红丰11、铁6915和辽豆21耐低温性次之,垦鉴豆35、海南2号、合丰50和NOVA耐低温性差。

参考文献

- [1] 宋剑陶,顾增辉.大豆抗冷性生理生化指标的筛选[J]. 中国农业科学,1992,25(4):15-23. (Song J T, Gu Z. Studies on screening for physiological and biochemical indicators of chilling resistance of soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1992, 25(4):15-23.)
- [2] 郝晶,张立军,谢甫绶.低温对大豆不同耐冷性中萌发期保护酶活性的影响[J]. 大豆科学,2007,26(2):171-175. (Hao J, Zhang L J, Xie P D. Effects of the low temperature on defense enzyme activities of different chilling-tolerant soybean cultivars during the germination [J]. Soybean Science, 2007, 26(2):171-175.)
- [3] 单彩云.大豆耐低温资源筛选及蛋白质组学研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008. (Shan C Y. Screening and proteome research of soybean low temperature tolerance germplasm [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008.)
- [4] 郝再彬,苍晶,徐仲.植物生理实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004. (Hao Z R, Cang J, Xu Z. Plant physiology experiment [M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2004.)
- [5] 时连辉.土壤水分胁迫对不同品种桑树的影响[D]. 济南:山东农业大学,2004. (Shi L H. Effect of soil water stress on different mulberry varieties [D]. Jinan: Shandong Agricultural University, 2004.)
- [6] 刘宁,高玉葆,贾彩霞.渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性的变化[J]. 植物生理学通讯,2000,36(1):11-14. (Liu N, Gao Y B, Jia C X. Changes in POD activity, free proline content and cytomembrane permeability of *Lolium multiflorum* leaves under different levels of osmotic stress [J]. Plant Physiology Communications, 2000, 36(1):11-14.)
- [7] 刘祖棋,张石城.植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社,1994. (Liu Z Q, Zhang S C. Physiology of plant resistance [M]. Beijing: Agricultural Press, 1994.)
- [8] Dhindsa R S. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *tortulia turalis* [J]. Plant Physiology, 1991, 95: 648-651.
- [9] Delauney A J, Verma D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants [J]. Plant Journal, 1993, 4(2): 215-223.
- [10] Ana Santa-Cruz, Manuel A costa, Ana Rus, et al. Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species [J]. Plant physiology, 1999, 37(1): 65-71.
- [11] Smirnoff N, Cumber Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057-1060.
- [12] Solomon A, Beer S, Waisel Y, et al. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline related compatible solutes [J]. Plant Physiology, 1994, 90: 198-204.
- [13] 张美云,钱吉,郑师章.渗透胁迫下野生大豆游离脯氨酸和可溶性糖的变化[J]. 复旦学报(自然科学版), 2001, 40(5): 558-561. (Zhang M Y, Qian J, Zheng S Z. Studies on free proline and soluble sugar of wild soybeans (*Glycine soja*) under osmotic stress [J]. Journal of Fudan University (Nature Science), 2001, 40(5): 558-561.)
- [14] Cohn M A, Obendorf R L. Occurrence of a stellar lesion during imbibitional chilling of *Zea mays* L [J]. American Journal of Botany, 1978, 65: 50-56.
- [15] Deswal D P, Sheoran I S. A simple method for seed leakage measurement: applicable to single seeds of any size [J]. Seed Science and Technology, 1993, 21: 179-185.
- [16] Lyons J M. Chilling injury in plants [J]. Plant Physiology, 1973, 20: 423-446.
- [17] 宰学明,吴国荣,陆长梅,等.低温预处理对大豆萌芽活力及其活性氧代谢的影响[J]. 大豆科学,2001,20(3):163-166. (Zai X M, Wu G R, Lu C M. The effects of prechilling on vigour index and active oxygen metabolism of soybean seeds [J]. Soybean Science, 2001, 20(3): 163-166.)
- [18] 陈少裕.膜脂过氧化与植物逆境胁迫[J]. 植物学通报, 1989, 6(4): 211-217. (Chen S Y. Membrane-lipid preoxidation and plant stress [J]. 1989, 6(4): 211-217.)