

## 抗坏血酸对大豆愈伤组织抗渗透胁迫的影响

常云霞<sup>1</sup>, 徐克东<sup>2</sup>, 李俐俐<sup>1</sup>, 周琳<sup>1</sup>, 陈龙<sup>1</sup>

(1. 周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001; 2. 周口师范学院 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南 周口 466001)

**摘要:**以周豆12为材料,研究了不同浓度的抗坏血酸(ASA)对盐胁迫下大豆愈伤组织生长的影响,以期为大豆抗盐胁迫研究提供参考。结果表明:盐胁迫下,大豆愈伤组织的相对含水量、相对干重增长速率、可溶性蛋白含量显著降低,Pro、MDA含量以及SOD、POD活性显著增加( $P < 0.01$ );施用ASA显著提高了盐胁迫下愈伤组织的相对含水量、相对干重增长速率、可溶性蛋白和Pro含量,SOD和POD活性也显著升高,膜脂过氧化产物MDA含量显著降低( $P < 0.01$ )。由此可见,ASA可以通过提高大豆愈伤组织的相对含水量、可溶性蛋白和Pro含量以及SOD、POD活性来维持细胞膜的稳定性,降低膜脂过氧化伤害程度,从而缓解盐胁迫对愈伤组织生长的抑制,并以 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源ASA缓解效应最好。

**关键词:**抗坏血酸;渗透胁迫;大豆愈伤组织

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2014)01-0066-04

## Effects of Ascorbic Acid on Soybean Callus Resisting to Osmotic Stress

CHANG Yun-xia<sup>1</sup>, XU Ke-dong<sup>2</sup>, LI Li-li<sup>1</sup>, ZHOU Lin<sup>1</sup>, CHEN Long<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China; 2. Key Lab of Plant Genetics & Molecular Breeding, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

**Abstract:** The response of soybean callus growth to ascorbic acid (ASA) under salt stress was studied, using soybean Zhongdou 12 as material. Under salt stress, the relative water content (RWC), soluble proteins content (SPC) and increase rate of dry weight (IRDW) were significantly decreased, the contents of proline (Pro) and malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) were significantly increased ( $P < 0.01$ ). When applied ASA, the RWC, SPC, IRDW, Pro, as well as SOD and POD activities were all increased, while the MDA content was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The results showed that ASA could effectively keep cytomembrane stabilization and reduce the damage from membrane lipid peroxidation, by which could mitigate the harmful effects from salt stress and promote the growth of callus, and the optimal ASA concentration was  $8.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Key words:** Ascorbic acid; Osmotic stress; Soybean callus

盐胁迫是世界范围内普遍存在的影响作物生长的逆境因子。中国的次生盐渍化土壤约占耕地面积的 $1/10$ <sup>[1]</sup>,因此,缓解盐胁迫对作物的损伤以提高作物产量成为众多学者关注的焦点。抗坏血酸(ASA)也称维生素C,是植物自身代谢过程中必不可少的物质,在植物的抗氧化作用、光合作用以及生长代谢等方面具有重要的生理作用<sup>[2]</sup>。ASA作为一种抗氧化剂,直接参与体内活性氧的清除,也可通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环清除过氧化氢,从而保护植物有机体及其正常代谢,防止氧化胁迫造成的伤害<sup>[3]</sup>。近年来ASA在提高植物抗逆性方面有广泛的应用,它可以缓解盐胁迫对小麦幼苗生长的抑制作用<sup>[4]</sup>,增强油菜的耐盐性<sup>[5]</sup>,缓解 $\text{O}_3$ 对水稻的胁迫作用<sup>[6]</sup>等。目前,有关外施ASA缓解盐胁迫对大豆毒害作用的研究报道较少。为此,本试验以大豆愈伤组织为材料,研究了外源ASA对盐胁迫

下大豆愈伤组织生长抑制的缓解效应及其机制,旨在为建立新的抗盐调控方法奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验设计

供试材料为周豆12,由周口市农业科学院提供。精选表面光滑、饱满的大豆种子,自来水冲洗10 min后,75%的酒精消毒30 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$ 浸泡10 min,无菌水冲洗5次。暗萌发24 h,切取种胚接到愈伤组织诱导培养基(MS培养基+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA)上,在弱光 $25^\circ\text{C}$ 条件下培养15~20 d形成愈伤组织。

挑选生长状况一致的大豆愈伤组织,转接到不同ASA处理的盐胁迫培养基上,处理培养基配方详见表1。每种处理接种大豆愈伤组织20瓶,3次重复。

收稿日期:2013-08-03

基金项目:河南省教育厅自然科学研究计划(2006210010,2011B180057)。

第一作者简介:常云霞(1978-),女,硕士,讲师,主要从事植物抗性生理研究。E-mail:changyx618@126.com。

通讯作者:陈龙(1962-),男,教授,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:chenlongzg@126.com。

表 1 处理培养基种类  
Table 1 The types of treatment mediums

培养基编号 Medium No.	培养基成分 Medium component
CK1	MS + 3 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA
CK2	MS + 3 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA + 100 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl
T1	MS + 3 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA + 100 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl + 2 mmol·L <sup>-1</sup> ASA
T2	MS + 3 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA + 100 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl + 4 mmol·L <sup>-1</sup> ASA
T3	MS + 3 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA + 100 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl + 8 mmol·L <sup>-1</sup> ASA
T4	MS + 3 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA + 100 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl + 16 mmol·L <sup>-1</sup> ASA

1.2 测定项目与方法

盐胁迫处理 4 d 后随机取大豆愈伤组织,采用称重法测定组织相对干重增长速率和组织含水量<sup>[7]</sup>;采用考马斯亮蓝 G-250 法测定可溶性蛋白含量<sup>[8]</sup>;采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)含量<sup>[9]</sup>;采用磺基水杨酸浸提法测定脯氨酸(Pro)含量<sup>[10]</sup>;采用愈创木酚法测定 POD 活性<sup>[11]</sup>;采用氮蓝四唑法测定 SOD 活性<sup>[12]</sup>。

1.3 数据分析

所有数据均取 3 次重复的平均值,采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 10.0 进行数据分析和差异显著性检验。

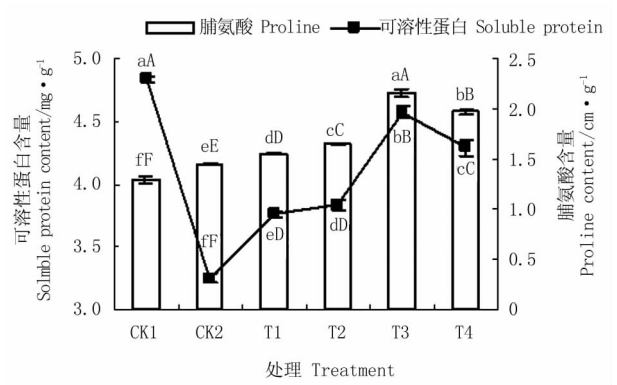
2 结果与分析

2.1 渗透胁迫下外源 ASA 对大豆愈伤组织中蛋白质和 Pro 含量的影响

可溶性蛋白质是植物所有蛋白组分中最活跃的一部分,包括各种酶原、酶分子和代谢调节物含量变化,是反映植物组织功能及衰老的可靠性指标之一<sup>[13]</sup>。图 1 表明,盐胁迫下大豆愈伤组织的可溶性蛋白质含量与 CK1 相比显著下降 32.85% ( $P < 0.01$ ),经 ASA 处理后,大豆愈伤组织可溶性蛋白含量随着 ASA 浓度的升高表现出先增加后减少的趋势,当 ASA 浓度为 8 mmol·L<sup>-1</sup> 时,可溶性蛋白质含量达到最大值,与 CK2 相比增加了 40.72% ( $P < 0.01$ )。说明适宜的 ASA 能促进可溶性蛋白质的积累,提高大豆愈伤组织对盐胁迫的耐受性。

植物体内的 Pro 是植物体内重要的渗透调节物质,其含量的变化可以认为是植物对逆境胁迫的一种生理生化反应<sup>[14]</sup>。图 1 表明,盐胁迫下大豆愈伤组织的 Pro 含量与 CK1 相比显著增加 11.7% ( $P < 0.01$ )。经 ASA 处理后,大豆愈伤组织 Pro 含量进一步增加,且随着 ASA 浓度的升高表现出先增加后

减少的趋势,当 ASA 浓度为 8 mmol·L<sup>-1</sup> 时,Pro 含量达到最大值,与 CK2 相比增加了 49.3% ( $P < 0.01$ )。表明 ASA 能够增加大豆愈伤组织盐胁迫后细胞内 Pro 的含量,有利于提高愈伤组织的抗盐性。



不同大小写字母分别代表各处理间在 0.01 和 0.05 水平差异显著,下同。

Different capital and lowercase letters were significantly different at 0.01 and 0.05 probability level, respectively. The same below.

图 1 渗透胁迫下外源 ASA 对大豆愈伤组织中可溶性蛋白和 Pro 含量的影响  
Fig. 1 Effects of exogenous ASA on soluble protein and proline content in soybean callus under low osmotic stress

2.2 渗透胁迫下外源 ASA 对大豆愈伤组织中抗氧化酶活性的影响

图 2 表明,渗透胁迫导致愈伤组织内 SOD 和 POD 活性增加,与 CK1 相比分别显著增加了 14.3%、15.9% ( $P < 0.01$ ),加入不同浓度 ASA 后, SOD 与 POD 活性均随 ASA 浓度增加呈先增加后略微降低的趋势,与 CK2 处理相比, SOD 活性逐渐增加了 7.7%、25.1%、33.5%、15.4%, POD 活性逐渐增加了 11.5%、17.9%、26.4%、20.4%,增加效果均极显著 ( $P < 0.01$ )。说明 ASA 能有效增加大豆愈伤组织清除体内自由基的能力,从而减轻渗透胁迫伤害。

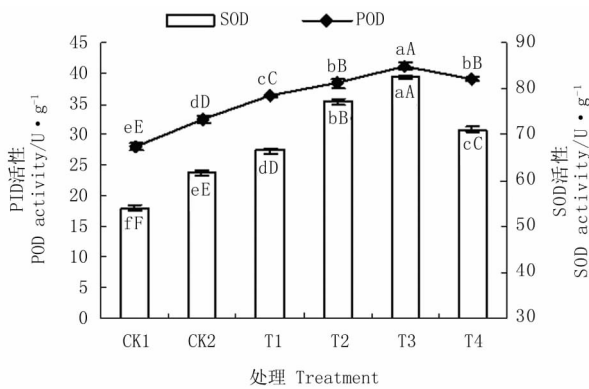


图2 渗透胁迫下外源ASA对大豆愈伤组织中抗氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effects of exogenous ASA on the activity of antioxidantase in soybean callus under low osmotic stress

### 2.3 渗透胁迫下外源ASA对大豆愈伤组织中相对含水量、相对干重增长速率和MDA含量的影响

图3表明,渗透胁迫导致愈伤组织相对含水量、相对干重增长速率下降,与CK1相比分别降低了26.2%、31.4%,均达极显著水平( $P < 0.01$ ),加入不同浓度ASA后,组织相对含水量、相对干重增长速率均随ASA浓度增加呈先增加后略微降低的趋势,与CK2处理相比组织相对含水量增加了9.1%、14.3%、22.2%、15.7%,相对干重增长速率增加了8.4%、13.8%、21.5%、15.7%,且增加效果均达极显著差异水平( $P < 0.01$ )。说明ASA能有效增加渗透胁迫下大豆愈伤组织保水能力,从而提高其对渗透胁迫的耐受性。

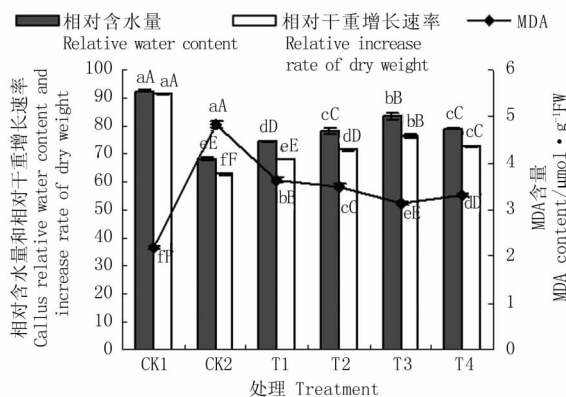


图3 渗透胁迫下外源ASA对大豆愈伤组织中相对含水量、相对干重增长速率和MDA含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous ASA on callus relative water content and increase rate of dry weight and MDA content in soybean callus under low osmotic stress

MDA是膜脂过氧化作用的主要产物之一,其量的高低是膜脂过氧化强弱和质膜破坏程度的重要

指标<sup>[15-16]</sup>。由图3可知,盐胁迫下大豆愈伤组织的MDA含量与CK1相比显著增加121% ( $P < 0.01$ ),经ASA处理后,大豆愈伤组织MDA含量显著降低,且随着ASA浓度的升高表现出先降低后略微增加的趋势,当ASA浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,MDA含量达到最低值,与CK2相比减少了34.8% ( $P < 0.01$ )。说明外施ASA能够有效阻止渗透胁迫下大豆愈伤组织内MDA含量的积累,从而减轻渗透胁迫的伤害。

### 3 讨论

盐胁迫对植物的影响主要表现在渗透胁迫、离子失调、氧化胁迫及代谢紊乱,植物对盐分胁迫的不同表现,是一系列生理生化过程在植物体内综合作用的结果<sup>[17]</sup>。本试验结果表明,盐胁迫显著降低了愈伤组织的相对含水量,导致愈伤组织相对干重增长速率降低。施用不同浓度ASA后,大豆愈伤组织的相对含水量和相对干重增长速率有所增加,从而缓解了盐胁迫的伤害作用。

细胞膜结构和功能的完整性是控制离子运输和分配的主导因素,同时也是植物在逆境中受伤害的主要部位<sup>[18]</sup>。当植物遭受盐胁迫时,首先细胞膜受到破坏,细胞膜透性增大,其次细胞内产生的 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 等活性氧自由基(ROS)增加,这些自由基的积累可导致MDA含量明显提高,导致细胞遭受氧化危害,植物需动员整个防御系统抵抗盐胁迫诱导的氧化伤害,而清除系统中SOD、POD和CAT的活性高低就成为控制伤害的决定因素<sup>[19]</sup>。SOD是清除生物体内 $\cdot\text{O}_2^-$ 的唯一酶类<sup>[20]</sup>,而POD和CAT是植物体内分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的关键酶,避免植物因 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的累积而造成伤害。盐胁迫下,植物体由于大量失水而产生渗透胁迫,植物为适应环境减小渗透势来增强植物细胞的渗透调节,一些渗透调节物质(可溶性蛋白和Pro)相继生成并积累<sup>[21]</sup>,本试验结果表明,施用ASA后,增加了大豆愈伤组织的抗氧化酶活性和渗透调节物质的量,从而缓解了盐胁迫对愈伤组织的伤害。

综上所述,施用不同浓度ASA后,促进了愈伤组织的生长,使愈伤组织的渗透调节物质含量增加,同时能诱导愈伤组织中SOD等抗氧化酶的产生,及时清除自由基,使MDA含量下降,缓解氧化损伤,从而减轻盐胁迫对愈伤组织的伤害。其中 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA缓解效果相对较好。

## 参考文献

- [1] 张乃群,刘彦娜,解艳华. 盐胁迫对野生大豆幼苗生长的影响[J]. 大豆科学,2012,31(6):920-923. (Zhang N Q, Liu Y N, Xie Y H. Effects of salt stress on growth of wild soybean (*Glycine soja*) seedlings[J]. Soybean Science,2012,31(6):920-923. )
- [2] 马雪瑞,段玉玺,陈立杰,等. 利用抗坏血酸揭示小粒黑豆对胞囊线虫抗性的研究[J]. 大豆科学,2011,30(1):123-126. (Ma X R, Duan Y X, Chen L J, et al. Revealing resistance of Xiaoliheidou to soybean cyst nematode by ascorbic acid[J]. Soybean Science,2011,30(1):123-126. )
- [3] Pingocchi C, Foyer C H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling CUIT opin[J]. Plant Biology,2003,132:1631-1641.
- [4] 常云霞,徐克东,周琳,等. 抗坏血酸对盐胁迫下小麦幼苗生长抑制的缓解效应[J]. 麦类作物学报,2013,33(1):151-155. (Chang Y X, Xu K D, Zhou L, et al. Ascorbic acid mitigating the inhibition of salt stress to wheat seedling growth[J]. Journal of Triticeae Crop,2013,33(1):151-155. )
- [5] Ahmad B. Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in canola exposure to salt stress[J]. Journal of Integrative Agriculture,2012,11(10):1610-1620.
- [6] 谢居清,李国学,王效科,等. 外源抗坏血酸对臭氧胁迫下水稻光合及生长参数的影响[J]. 中国农业生态学报,2009,17(6):1176-1181. (Xie J Q, Li G X, Wang X K, et al. Effect of exogenous ascorbic acid on photosynthesis and growth of rice under O<sub>3</sub> stress[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17 ( 6 ): 1176-1181. )
- [7] 龚富生,张嘉宝. 植物生理学实验[M]. 北京:气象出版社,1995. (Gong F S, Zhang J B. Plant physiology experiment[M]. Beijing:China Meteorological Press,1995. )
- [8] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000. (Zou Q. Plant physiology experimental direction[M]. Beijing:China Agriculture Press,2000. )
- [9] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006. (Wang X K. Plant physiology and biochemistry experiment; principle and technology[M]. Beijing:Higher Education Press,2006. )
- [10] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2003. (Zhang Z L. Plant physiology experimental direction[M]. Beijing:Higher Education Press,2003. )
- [11] 刘萍,李明军. 植物生理学实验技术[M]. 北京:科学出版社,2008. (Liu P, Li M J. Plant physiology experimental technology[M]. Beijing:Science Press,2008. )
- [12] 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,2003. (Li H S. Plant physiology and biochemistry experiment; principle and technology[M]. Beijing: Higher Education Press,2003. )
- [13] 郑殿峰,宋春艳. 植物生长调节剂对大豆氮代谢相关生理指标以及产量和品质的影响[J]. 大豆科学,2011,30(1):109-112. (Zheng D F, Song C Y. Effects of plant growth regulators (PGRs) on nitrogen metabolism related indicators and yield in soybean[J]. Soybean Science,2011,30(1):109-112. )
- [14] 纪展波,蒲伟凤,李桂兰,等. 野生大豆、半野生大豆和栽培大豆对苗期干旱胁迫的生理反应[J]. 大豆科学,2012,31(4):598-604. (Ji Z B, Pu W F, Li G L, et al. Physiological reaction of *Glycine soja*, *Glycine gracilis* and *Glycine max* to drought stress in seedling stage[J]. Soybean Science,2012,31(4):598-604. )
- [15] 张春平,何平,刘海英,等. 外源性5-氨基乙酰丙酸对盐胁迫下决明子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 中草药,2012,43(4):778-787. (Zhang C P, He P, Liu H Y, et al. Effect of exogenous 5-aminolevulinic acid on seed germination and physiological characteristics of *Cassia obtusifolia* seedlings under NaCl stress[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2012,43(4):778-787. )
- [16] 常云霞,徐克东,陈璨,等. 水杨酸对低温胁迫下大豆幼苗生长抑制的缓解效应[J]. 大豆科学,2012,31(6):927-931. (Chang Y X, Xu K D, Chen C, et al. Salicylic acid mitigating the inhibition of low temperature stress to soybean seedling growth[J]. Soybean Science,2012,31(6):927-931. )
- [17] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2008. (Pan R C. Plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press,2008. )
- [18] 邢承华,郑寨生,张尚法,等. 黑豆根尖边缘细胞对盐胁迫的防护效应[J]. 大豆科学,2012,31(3):416-419. (Xing C H, Zheng Z S, Zhang S F, et al. Protective effect of root border cells on salt stress in black soybean[J]. Soybean Science, 2012, 31 ( 3 ): 416-419. )
- [19] Jiang Y, Huang B. Drought and heat stress injury to two cool season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation[J]. Crop Science,2001,41:436-442.
- [20] Hosseini Boldaji S A, Khavari Nejad R A, Hassan Sajedi R, et al. Water availability effects on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Acta Physiologiae Plantarum,2012,34:1177-1186.
- [21] 宰学明,邵志广,钦佩. 盐胁迫对滨梅幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J]. 北方园艺,2012(19):12-14. (Zai X M, Shao Z G, Qin P. Effects of NaCl stress on the growth and contents of osmotic adjustment substance of *Prunus maritima* seedling[J]. Northern Horticulture,2012(19):12-14. )