

王华华,黄俊骏,杨丽丹. 大豆幼苗中抗坏血酸和谷胱甘肽对干旱胁迫的生理响应[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):86-88.

大豆幼苗中抗坏血酸和谷胱甘肽对干旱胁迫的生理响应

王华华,黄俊骏,杨丽丹

(河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007)

摘要:以抗旱的大豆品种豫豆 24、对照品种周豆 11 为试验材料,以聚乙二醇(PEG)模拟干旱胁迫条件,探讨了不同干旱胁迫下抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量的动态变化及其在清除活性氧过程中的作用。结果表明,干旱胁迫增加了 2 个大豆品种中 AsA 和 GSH 含量,两者均在 10% PEG 处理 48 h 时达到最大值,抗旱品种豫豆 24 比对照品种周豆 11 增加幅度大,表明 AsA 和 GSH 可能参与了大豆的抗旱响应;干旱胁迫显著增加了 2 个大豆品种中过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 含量,抗旱品种豫豆 24 的增幅低于对照品种周豆 11;AsA 和 GSH 抑制剂处理进一步增加了干旱胁迫下大豆根中活性氧和丙二醛含量。表明干旱胁迫下 AsA 和 GSH 在清除活性氧从而增强大豆抗旱性中起着重要的作用。

关键词:大豆;干旱胁迫;活性氧;抗坏血酸;还原型谷胱甘肽;抗旱性

中图分类号: S565.101;Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0086-03

干旱是限制作物产量和质量的主要逆境因子。研究表明,全世界由于干旱造成的作物减产超过了其他逆境因子危害的总和^[1]。干旱胁迫能干扰植物细胞中活性氧(ROS)产生与清除之间的平衡,导致植物细胞遭受氧化胁迫。在正常条件下,植物细胞中产生的 ROS 与其清除系统保持平衡,而当植物遭受环境胁迫使体内产生的 ROS 超出其清除系统的能力范围时,就会引起 ROS 累积产生氧化伤害,导致生物膜脂过氧化、蛋白质变性、DNA 链断裂及光合受阻等多种有害的细胞学效应,使细胞功能失常,机体出现各种自由基综合征^[2]。

增强抗氧化系统能力是植物适应干旱逆境的重要生理机制。植物体内除了酶促抗氧化机制外,还存在非酶促抗氧化机制。抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)是植物体内高丰度的小分子抗氧化物质,是抗氧化系统的重要组成部分,在植物抵抗氧化胁迫中具有重要作用^[3]。AsA 是植物体内一个主要代谢物,是控制 ROS 含量至关重要的抗氧化物,对细胞的氧化还原系统有极其重要的缓冲作用^[4]。还原型谷胱甘肽对自由基有直接清除作用。AsA 和 GSH 的代谢途径 AsA-GSH 循环系统在植物抵抗氧化胁迫、清除 ROS 方面具有重要作用,两者含量高低与植物的抗逆性密切相关^[5-6]。研究 AsA 和 GSH 对干旱胁迫的生理响应,对揭示作物抗氧化和抗旱机制具有重要意义。

众多研究是以某一品种作为试验材料,研究干旱胁迫下植物的抗旱机制。本试验采用聚乙二醇(PEG)处理模拟干旱胁迫,以 2 种抗旱性不同的大豆品种为试验材料,通过不同干旱胁迫程度,研究干旱胁迫下大豆幼苗根中 AsA 和 GSH 含量的动态变化过程以及在清除 ROS 过程中的可能调节作用,为

进一步揭示干旱胁迫下大豆的抗旱机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以抗旱性强的豫豆 24 和抗旱性弱的周豆 11 为供试大豆(*Glycine max.*)品种,大豆种子由河南省周口市农业科学院提供。

1.2 材料培养

挑选大小一致的大豆种子,用 5% 次氯酸钠消毒 15 min 后,用自来水反复冲洗干净,放入水中浸泡 2 h 使种子充分吸水,然后将种子置于恒温箱内 25 °C 黑暗条件下萌发 2 d。挑选萌发一致的大豆种子,将其放在装有蛭石的托盘里,并用 1/4 Hoagland 溶液浇灌。培养条件为 25 °C,14 h/d 光周期,光强 150 m²/s,相对湿度控制在 70%。

1.3 材料处理

以聚乙二醇(PEG)6000 模拟干旱胁迫处理。将生长 3 d 的幼苗取出洗净后转移到盛有 PEG、1 mmol/L 吡啶黄素、2 mmol/L 丁基硫基亚胺(BSO)溶液的塑料容器中进行不同处理。处理到指定时间后收集大豆主根用于测定各项指标。

1.4 测定方法

AsA 和 GSH 的测定参照 de Pinto 等的方法^[7]。当向粗提液中加入二硫苏糖醇(DTT)时,脱氢抗坏血酸(DHA)被还原成 AsA,此时测得的数值为总的抗坏血酸的含量,DHA 的含量是总的抗坏血酸与 AsA 的差值。GSH 的含量是总的谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽(GSSG)的差值; H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量测定参照 Wang 等的方法^[8];MDA 含量测定参照 Wang 等的方法^[9]。测定时重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 不同干旱胁迫水平对 AsA 和 GSH 含量的影响

不同浓度 PEG 处理大豆 1 d,随着 PEG 浓度的增大,2 种大豆根中 AsA 和 GSH 含量表现出先增加后降低的趋势,对照品种周豆 11 在 10% PEG 处理时达到最大值,抗旱品种豫豆

收稿日期:2014-01-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1204305);河南省基础与前沿技术研究(编号:132300410455);河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:13A180515);河南师范大学博士启动课题(编号:11126、11129)。

作者简介:王华华(1980—),男,湖北汉川人,博士,副教授,主要从事植物逆境生理研究。E-mail: hhwang04@163.com。

24 在 15% PEG 处理时达到最大值,且抗旱品种豫豆 24 比对照品种周豆 11 中 AsA 和 GSH 含量一直较高(图 1)。从植株生长状况上,当 PEG 处理浓度大于 15% 时,周豆 11 植株表现明显萎蔫现象,而豫豆 24 则无明显萎蔫。后续试验选定中等胁迫程度(10% PEG)作为干旱胁迫处理的浓度。

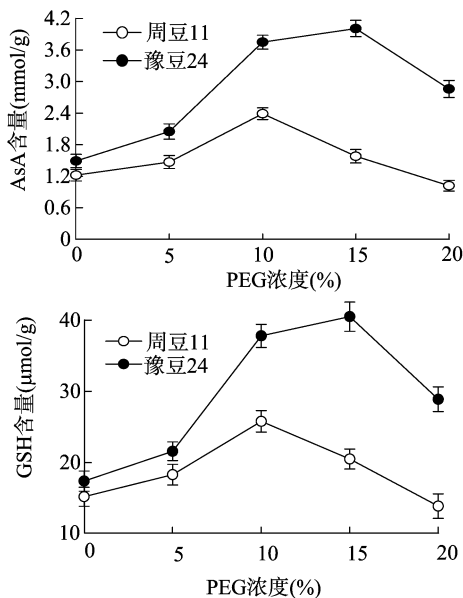


图1 不同干旱胁迫处理对大豆AsA和GSH含量的影响

为了明确干旱胁迫下大豆根中 AsA 和 GSH 含量的动态变化,测定了干旱胁迫下 AsA 和 GSH 含量变化过程。如图 2 所示,在正常营养液培养条件下,2 个大豆品种中 AsA 及 GSH 含量差异并不明显,但在干旱胁迫条件下,随着处理时间的延长,大豆周豆 11 和豫豆 24 根中 AsA 及 GSH 含量均是先上升后下降,变化趋势基本一致,在处理 48 h 时均达到最大值,随着处理时间的延长,AsA 及 GSH 含量有所下降,但仍比对照要高,抗旱品种豫豆 24 在各个时间段含量均显著高于对照品种周豆 11,表明干旱条件下,抗旱品种豫豆 24 可能通过产生更多的 AsA 和 GSH 来抵御干旱胁迫对植物造成的氧化胁迫。48 h 后继续干旱胁迫处理,大豆 AsA 及 GSH 的含量开始有所降低,可能是随着干旱胁迫程度加重,植物体受到伤害较大,AsA 及 GSH 含量下降。

2.2 干旱胁迫对活性氧含量的影响

大豆根中 AsA 及 GSH 含量在处理 48 h 时达到最大值。表明在 48 h 时抗氧化能力达到最高,因此选取处理 48 h 时 2 个试验材料分析其体内 H_2O_2 及 $O_2^{\cdot-}$ 的含量变化(图 3)。正常条件下,2 个大豆品种中 H_2O_2 含量均为 120 nmol/g 左右,品种间差异不显著。干旱条件下处理 48 h 时,抗旱品种豫豆 24 中 H_2O_2 含量为 170 nmol/g,对照品种周豆 11 中 H_2O_2 含量为 260 nmol/g,显著高于正常环境条件,豫豆 24 比周豆 11 中 H_2O_2 含量低。2 个大豆品种中 $O_2^{\cdot-}$ 含量也表现出与 H_2O_2 含量变化类似的趋势。原因可能是在干旱胁迫条件下,豫豆 24 中 AsA 及 GSH 含量增加得更多,可以用来清除更多的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$,以降低对植物体造成的氧化伤害。

2.3 干旱胁迫下 AsA 和 GSH 合成抑制剂对活性氧和 MDA 含量的影响

活性氧和 MDA 含量是衡量氧化胁迫程度的 2 个重要指

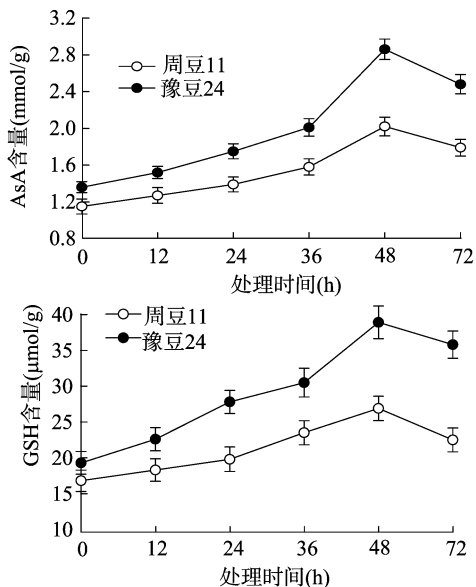


图2 干旱胁迫处理不同时间对大豆AsA和GSH含量的影响

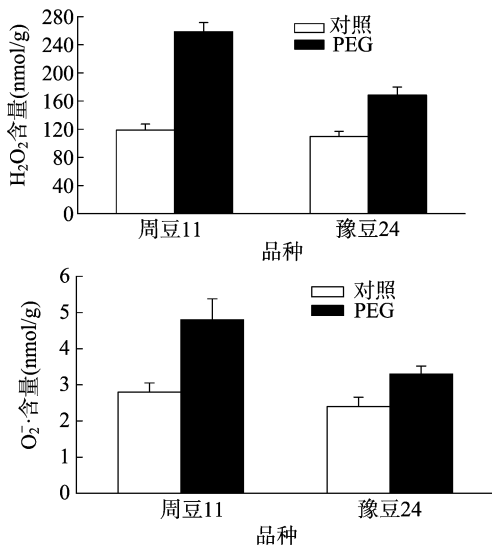


图3 干旱胁迫处理对 2 个大豆品种活性氧含量的影响

标^[10]。为了进一步证实干旱胁迫下大豆根中 AsA 和 GSH 含量的增加与植物抗旱性的关系,本试验应用 AsA 和 GSH 合成抑制剂处理,测定了干旱胁迫下大豆品种中活性氧和 MDA 含量的变化。由表 1 可知,干旱胁迫下 AsA 和 GSH 合成抑制剂吡啶黄素和丁基硫堇亚胺处理使得大豆根中活性氧和 MDA 含量均显著增加,表明抑制 AsA 和 GSH 合成导致干旱胁迫对大豆植株造成的氧化胁迫加剧。干旱胁迫下抑制剂处理后使抗旱品种豫豆 24 比对照品种周豆 11 活性氧和 MDA 含量增幅更大,表明干旱胁迫下大豆幼苗通过增加 AsA 和 GSH 含量来清除过量活性氧的产生,避免植株遭受严重的氧化伤害,增强植株对干旱的耐受性。

3 讨论与结论

干旱胁迫对植物的伤害很大程度上是通过破坏生物膜的生理功能。当植物受到干旱、盐渍等逆境胁迫时,活性氧的代谢平衡被破坏,导致自由基大量积累,最终导致植物细胞膜脂

表 1 干旱胁迫下抗坏血酸和谷胱甘肽合成抑制剂对活性氧和 MDA 含量的影响

处理	H ₂ O ₂ 鲜重含量 (nmol/g)		O ₂ ⁻ · 鲜重含量 (nmol/g)		MDA 鲜重含量 (mmol/g)	
	周豆 11	豫豆 24	周豆 11	豫豆 24	周豆 11	豫豆 24
对照	118.6 ± 6.8	109.7 ± 4.7	2.8 ± 0.33	2.4 ± 0.31	2.5 ± 0.22	2.2 ± 0.18
PEG	258.6 ± 12.8	168.5 ± 11.5	4.8 ± 0.45	3.3 ± 0.36	4.6 ± 0.39	3.5 ± 0.24
PEG + A	308.7 ± 13.9	258.4 ± 12.2	6.2 ± 0.55	4.1 ± 0.37	6.5 ± 0.51	5.5 ± 0.38
PEG + BSO	329.6 ± 15.6	289.6 ± 13.8	6.8 ± 0.58	4.6 ± 0.42	7.5 ± 0.68	6.3 ± 0.52

注:PEG + A、PEG + BSO 分别表示干旱 + 吡啶黄素、干旱 + 丁基硫莰亚胺。

过氧化^[11-12]。能否及时清除过量积累的活性氧,缓解氧化胁迫对细胞造成的伤害,在一定程度上反映了植物耐干旱等逆境胁迫能力的强弱。本研究表明,干旱胁迫下对照品种周豆 11 中活性氧和 MDA 含量均显著高于抗旱品种豫豆 24,表明周豆 11 比豫豆 24 遭受了更严重的氧化胁迫伤害,证实了豫豆 24 比周豆 11 更抗旱。

植物遭受氧化胁迫后,体内也会产生相应的适应机制。AsA、GSH 等小分子抗氧化物就是一种重要的清除活性氧的非酶促途径。本研究结果表明,干旱胁迫下 2 个大豆品种根中 AsA 和 GSH 含量均显著增加,抗旱品种豫豆 24 比对照品种周豆 11 含量更高,表明干旱胁迫下 AsA 和 GSH 含量的增加与大豆抗旱性有关,与单长卷等研究黄土高原冰草叶片的结果^[13]一致。随着干旱胁迫进一步加强,过多的活性氧不能被及时清除,就会生成破坏力更强的羟自由基(OH·),加快膜脂过氧化进程,使得蛋白质、DNA 等生物大分子受到破坏,导致一系列生理生化代谢紊乱,植物生长也受到抑制,这是本研究中发现干旱胁迫后期大豆根中 AsA 及 GSH 含量下降的原因。

在植物细胞中,GSH 代谢 H₂O₂ 主要是通过 AsA - GSH 循环来完成,这是植物细胞中最重要的一个脱毒系统^[14]。为了进一步证实大豆抗旱性的增强是通过干旱胁迫下 AsA 和 GSH 含量的增加来实现的,本试验应用 AsA 和 GSH 合成抑制剂处理,结果表明,抑制剂处理均进一步增加了大豆品种遭受氧化伤害的程度,表明干旱胁迫下大豆中确实存在着 AsA - GSH 这一清除活性氧的调节机制,以此来增强大豆对干旱的耐受性。原因可能是干旱胁迫下 AsA 及 GSH 含量的升高,使得抗性品种的活性氧被及时清除,同时为 AsA - GSH 循环的正常运转及 AsA、GSH 的再生提供了有力保障,对照品种 AsA - GSH 循环的运转受阻,AsA、GSH 的再生受到抑制,使得过量积累的活性氧不能被及时清除^[15]。抗性品种在干旱胁迫期间活性氧含量的增幅低于同期的对照品种。

干旱胁迫下 2 个大豆品种在 AsA 和 GSH 代谢方面均发生了显著变化,抗性品种在胁迫期间能够保持较高的 AsA 及 GSH 含量,维持了高水平的抗氧化物质和较强的氧化还原力,使过量产生的活性氧能被及时清除,维持了植物体内氧化还原反应的相对平衡,尽可能减少了活性氧对植物体的损伤。维持 AsA - GSH 循环快速有效运转,保持相对较高的 AsA 及 GSH 水平对提高大豆的抗氧化胁迫能力、增强大豆抗旱能力具有重要作用。

参考文献:

[1]Chen T H,Murata N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes[J].

Current Opinion in Plant Biology,2002,5(3):250 - 257.
[2]赵丽英,邓西平,山 仑. 活性氧清除系统对干旱胁迫的响应机制[J]. 西北植物学报,2005,25(2):413 - 418.
[3]Shao H B,Chu L Y,Shao M A,et al. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses[J]. Comptes Rendus Biologies,2008,331(6):433 - 441.
[4]Noctor G,Foyer C H. Ascorbate and glutathione:keeping active oxygen under control[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,1998,49:249 - 279.
[5]Farfan - Vignolo E R,Asard H. Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2012,59:55 - 62.
[6]Saruhan N,Terzi R,Saglam A,et al. The relationship between leaf rolling and ascorbate subjected to drought stress[J]. Biological Research,2009,42(3):315 - 326.
[7]de Pinto M C,Francis D,de Gara L. The redox state of the ascorbate - dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY - 2 cells[J]. Protoplasma,1999,209(1/2):90 - 97.
[8]Wang H H,Huang J J,Bi Y R. Nitrate reductase - dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots[J]. Plant Science,2010,179(3):281 - 288.
[9]Wang H H,Liang W H,Huang J J. Putrescine mediates aluminum tolerance in red kidney bean by modulating aluminum - induced oxidative stress[J]. Crop Science,2013,53(5):2120 - 2128.
[10]Sharma S S,Dietz K J. The significance of amino acids and amino acid - derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress[J]. Journal of Experimental Botany,2006,57(4):711 - 726.
[11]Hasegawa P M,Bressan R A,Zhu J K,et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. Annu Rev Plant Mol Plant Physiol,2000,51:463 - 499.
[12]Dutilleul C,Garmier M,Noctor G,et al. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis,set antioxidant capacity,and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation[J]. Plant Cell,2003,15(5):1212 - 1226.
[13]单长卷,韩蕊莲,梁宗锁. 黄土高原冰草叶片抗坏血酸和谷胱甘肽合成及循环代谢对干旱胁迫的生理响应[J]. 植物生态学报,2011,35(6):653 - 662.
[14]Nakano Y,Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate - specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant & Cell Physiology,1981,22(5):867 - 880.
[15]马春花,李明军,李翠英,等. 不同抗性苹果砧木叶片抗坏血酸代谢对干旱胁迫的响应[J]. 西北植物学报,2011,31(8):1596 - 1602.