

菜用大豆耐低温弱光鉴定方法和评价指标的研究

陈远东¹,顾卫红¹,马坤¹,韩伟²,杨红娟¹

(¹上海市农业科学院园艺研究所,上海 201106;²南京农业大学大豆研究所,南京 210095)

摘要:为建立一套有效、可靠的菜用大豆耐低温弱光鉴定方法和评价指标,选择12个熟性不同的春播型菜用大豆品种材料,通过对其在低温弱光胁迫下种子发芽快慢、幼苗存活率及相关生理生化指标等的检测分析,鉴定各品种材料对低温弱光逆境胁迫反应的差异。结果表明,在弱光低温组合60~80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、12 $^{\circ}\text{C}$ 的逆境胁迫下,12个菜用大豆品种材料的出苗快慢、幼苗存活率及叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)及过氧化氢酶(CAT)活性等存在差异,相关分析表明保护性酶活性与光温组合呈极显著正相关。

关键词:菜用大豆;低温;弱光;鉴定方法;评价指标

中图分类号:S643.7

文献标志码:A

论文编号:2011-0691

Study on Index of Evaluation and Method of Identification in Low Temperature and Weak Light Tolerance of Vegetable Soybean

Chen Yuandong¹, Gu Weihong¹, Ma Kun¹, Han Wei², Yang Hongjuan¹

(¹Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106;

²Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: To establish an effective, reliable identification method and evaluation index of soybean resistance to low temperature and weak light, twelve vegetable soybean strains were primary studied on the difference of adaptability to low temperature and weak light with germination time, survival ratio, index of biochemistry and morphology. The results were proved germination time, survival ratio, active of SOD, POD and CAT of vegetable soybean existed evident differences under the condition of light (60–80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$), temperature (12 $^{\circ}\text{C}$), and relevant analysis showed that the protective enzyme activity and light temperature combination was very significant positive correlation.

Key words: vegetable soybean; low temperature; weak light; method of identification; index of evaluation

0 引言

菜用大豆(vegetable soybean)俗称毛豆,系鼓粒末期籽粒饱满而尚未老熟,荚色、籽粒色翠绿时采青供食用的大豆,是大豆的专用型品种^[1],目前在中国长江以南地区形成了春播早熟菜用大豆生产的优势区域带。菜用大豆品质的优劣及产量的高低,主要是其在发育过程中逐渐形成的^[2]。因长江以南地区早春惯有的持续低温(10~15 $^{\circ}\text{C}$)和阴雨弱光照不良气候条件,导致常规菜用大豆品种播种后种子不出苗或出苗缓慢,特别

是烂种严重,这成为制约中国南方地区春播型早熟栽培菜用大豆生产发展的重要限制因子^[3-5]。培育耐低温弱光菜用大豆品种是解决这一问题的关键。

目前,国内开展菜用大豆耐低温弱光研究较少。众多学者的研究表明,植物在低温弱光逆境下体内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的变化可作为植物抗逆性鉴定的评价指标,同时 Lyons 和 Raison 也提出植物低温伤害的膜脂相变假说^[6]。笔

基金项目:上海市科委农业科技成果转化项目(093919N1400)。

第一作者简介:陈远东,男,1983年出生,江西上饶人,研究实习员,硕士,研究方向为蔬菜遗传育种。通信地址:201106 上海市农业科学院园艺研究所, Tel: 021-62204855, E-mail: chenyd0926@163.com。

通讯作者:顾卫红,女,1964年出生,江苏人,研究员,硕士,研究方向为蔬菜遗传育种。通信地址:201106 上海市农业科学院园艺研究所, Tel: 021-62204855, E-mail: guwh518@yahoo.com.cn。

收稿日期:2011-03-17,修回日期:2011-05-29。

者通过检测 12 个熟性不同的春播型菜用大豆品种材料在低温弱光条件下的出苗快慢、植株成苗后的存活率及植株体内 SOD、POD、CAT 的活性等相关生理生化性状,分析不同菜用大豆品种在温光逆境胁迫下各性状的变化规律,以建立一套有效、可靠的菜用大豆耐低温弱光鉴定方法和评价指标,为发掘优异抗逆基因及开展菜用大豆耐低温弱光性新品种的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

田间试验于 2008 年 6 月始在上海市农业科学院动植物引种中心进行,室内试验于 2008 年 7 月始在上海市农业科学院园艺研究所进行。

1.2 试验材料

由上海农业科学院园艺研究所提供的 12 个菜用大豆品种材料,具体为:‘沪宁 95-1’、‘青酥二号’、‘奎丰四号’、‘台 292’、VS-2、VS-3、VS-17、VS-26、VS-42、VS-43、VS-46 及 VS-48。

1.3 试验方法

1.3.1 临界低温弱光条件的确定 试验初步分成 3 个光温组合。以正常光温组合 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 16°C 做为参照, $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照强度为弱光处理, 8°C 与 12°C 为低温处理。2008—2010 年,将 12 个菜用大豆品种分别选择 30 粒饱满种子,播种在 50 孔育苗穴盘内,播种前将育苗营养土浇足底水,每孔播种 2 粒种子,盖上 1.5 cm 厚湿润营养土,再盖上一层白色薄膜保湿,然后分别放置在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 16°C , $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 12°C 及 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 8°C 等 3 个不同光温处理组合的人工气候培养箱内培养。

1.3.2 酶液的提取 酶液的提取按陈劲枫等^[7]的改进方法:称取 0.2 g 菜用大豆叶片样品,加入 1.6 mL 的预冷 PBS(0.1 mol/L)提取缓冲液, pH 7.8,冰浴研磨至匀浆,4000 r/min 4°C 下离心 20 min,上清液保存于 -70°C 冰箱备用。

1.3.3 测定项目

(1) 出苗时间:菜用大豆出苗的时间长短以种子播种后到出苗的天数计算。

(2) 植株存活率:植株存活率=(成株株数/播种数) $\times 100\%$

(3) 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定方法: SOD 活性的测定参考李合生^[8]的方法,以抑制 NBT 光化学还原的 50% 为 1 U。

(4) 过氧化物酶(POD)活性的测定方法:采用张志良^[9]的改进方法:在玻璃比色皿中依次加入 2 mL

0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 6.0), 1 mL 0.25% 愈创木酚溶液, 0.04 mL 酶液、0.1 mL 0.75% H_2O_2 溶液,迅速颠倒混匀后立即比色,每隔 40 s 读取 A_{470} 值,共 2 min,以每分钟 A_{470} 上升 1 为 1 U。

(5) 过氧化氢酶(CAT)活性的测定方法:采用紫外分光光度计法,在石英比色杯皿中依次加入 3 mL CAT 反应液(0.05 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0, 内含 15 mmol/L H_2O_2), 0.04 mL 酶液,迅速颠倒混匀后立即比色,每隔 40 s 读取 A_{240} 值,共 2 min,以 A_{240} 每分钟下降 1 为 1 U。

1.3.4 统计分析 运用 SPSS 软件对所测保护性酶活性指标和光温组合的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 临界低温弱光条件的确定

在本研究中,考察 12 个菜用大豆品种在 3 个光温组合下植株存活率,结果见表 1。以正常光温组合 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 16°C 条件下所有菜用大豆品种存活率做为参照。光温组合 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 8°C 条件下,所有菜用大豆品种都没有出苗,由此确定 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 8°C 的光温条件下,菜用大豆是不宜生长的,而在光温组合 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 12°C 条件下,所有菜用大豆品种存活率在 20%~50%。因此初步选择光温组合 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 12°C 条件作为本研究的临界低温弱光处理条件,不再将光温组合 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 8°C 条件作为本研究的处理条件。

表 1 3 个光温组合下菜用大豆植株存活率

光照/ $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$	300	60~80	60~80
温度/ $^\circ\text{C}$	16	12	8
沪宁 95-1	80	50	0
青酥二号	77	43	0
奎丰四号	53	33	0
台 292	63	30	0
VS-2	77	43	0
VS-3	70	37	0
VS-17	60	30	0
VS-26	63	23	0
VS-42	73	37	0
VS-43	53	30	0
VS-46	67	33	0
VS-48	70	37	0

2.2 不同光温胁迫条件下各菜用大豆品种的主要生物学反应

为了解菜用大豆 12 个品种对低温弱光胁迫条件的反应,观测了低温弱光组合 $60\sim 80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 12°C 胁

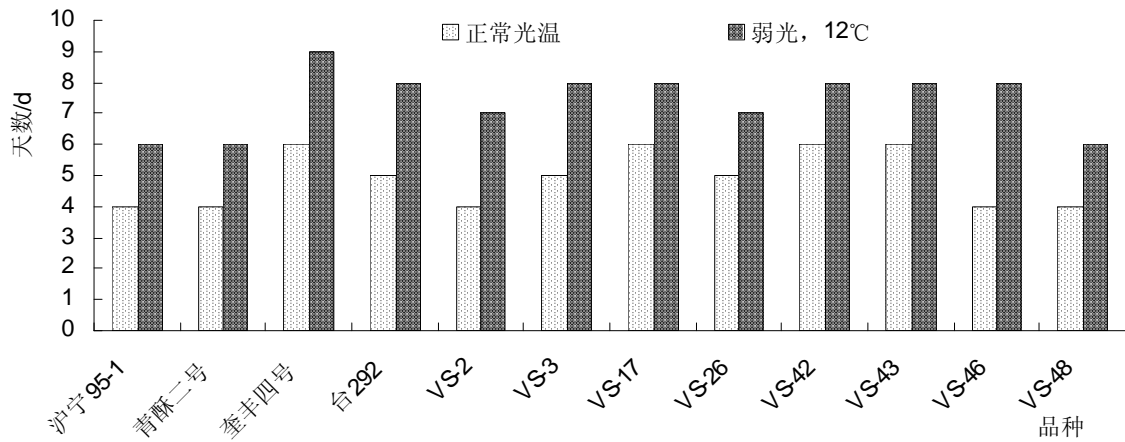


图1 菜用大豆出苗时间

迫和正常光温组合下各品种の出苗快慢,结果见图1。

从图1可以看出,在正常光温(300 μmol/(m²·s)、16°C)和弱光温(60~80 μmol/(m²·s)、12°C)2个处理条件下,各品种の出苗时间存在差异。其中,菜用大豆‘沪宁95-1’、VS-46、VS-2、‘青酥二号’、VS-48等在正常光温条件下出苗时间最短,为4天;‘奎丰四号’、VS-17和VS-43の出苗时间相对较长,为6天。但在低温弱光处理条件下(60~80 μmol/(m²·s)、12°C)各菜用大豆品种の出苗时间均比正常光温条件下的出苗时间延长,其中菜用大豆‘沪宁95-1’、‘青酥二号’和VS-48出苗时间最短,为6天;‘奎丰四号’の出苗时间最长,为9天;其余品种都在7~8天。表明低温弱光胁迫条件下种子的发芽出苗速度可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的一个评价指标。

进一步观测低温弱光组合60~80 μmol/(m²·s)、12°C胁迫和正常光温组合下各菜用大豆品种的幼苗存活株数,结果见图2。

由图2可以看出,在低温弱光胁迫条件下(60~

80 μmol/(m²·s)、12°C),各品种的幼苗存活率均比正常光温处理条件下(300 μmol/(m²·s)、16°C)的存活株率低,但不同品种存活株率降低程度存在差异。在低温弱光胁迫条件下(60~80 μmol/(m²·s)、12°C),菜用大豆‘沪宁95-1’的存活株数为最多,为15株,其次是‘青酥二号’和VS-2,其余品种的存活株数都在13株以下。表明低温弱光胁迫条件下幼苗的存活率可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的一个评价指标。

2.3 2个光温组合条件下菜用大豆的主要生理生化指标

由图3可以看出,在低温弱光胁迫条件下所有菜用大豆品种叶片中SOD活性均增强(除菜用大豆VS-26),其中‘沪宁95-1’、‘青酥二号’、VS-2和VS-48在低温弱光胁迫条件下,叶片中SOD活性比其他品种强,说明SOD活性可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的一个评价指标。

由图4可以看出,在低温弱光胁迫条件下,各品种菜用大豆叶片的POD活性都增强。其中,‘沪宁95-1’、

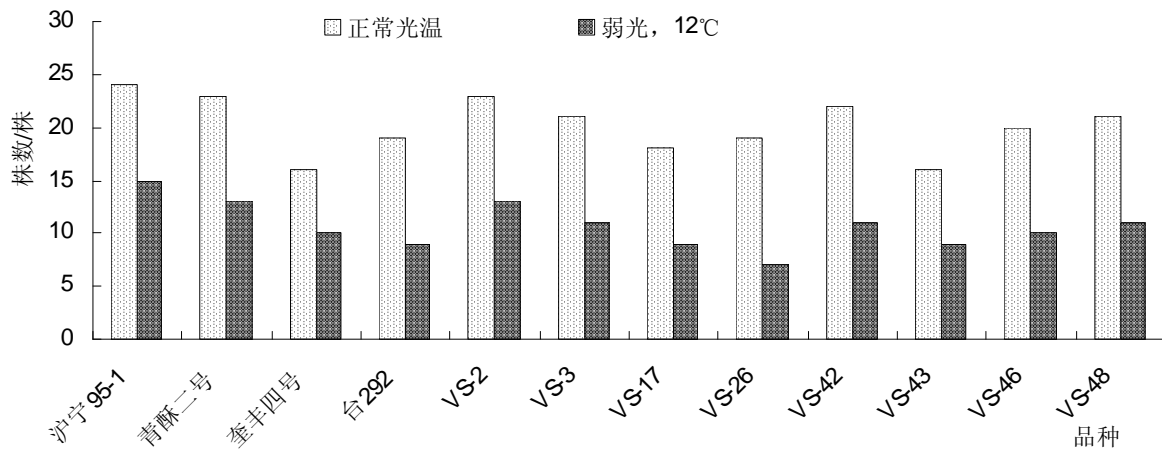


图2 菜用大豆存活株数

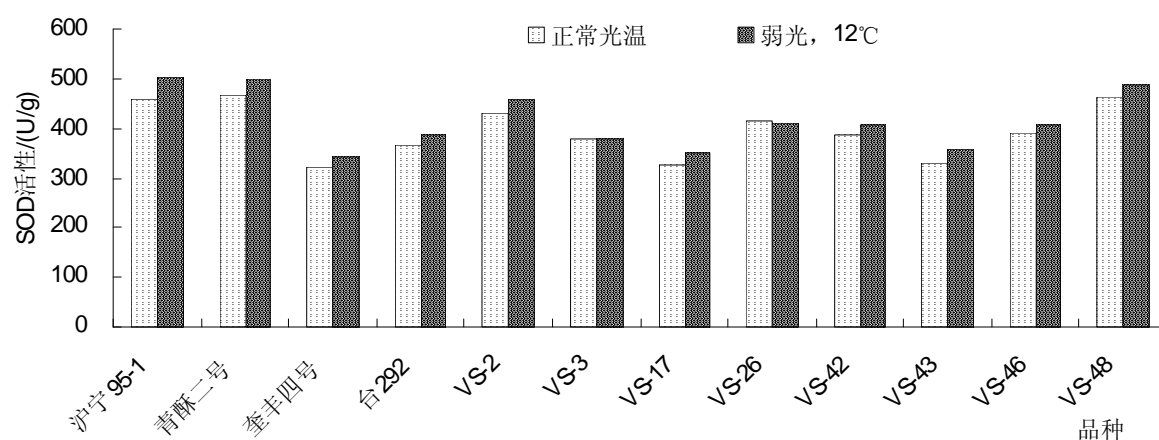


图3 菜用大豆叶片 SOD 活性

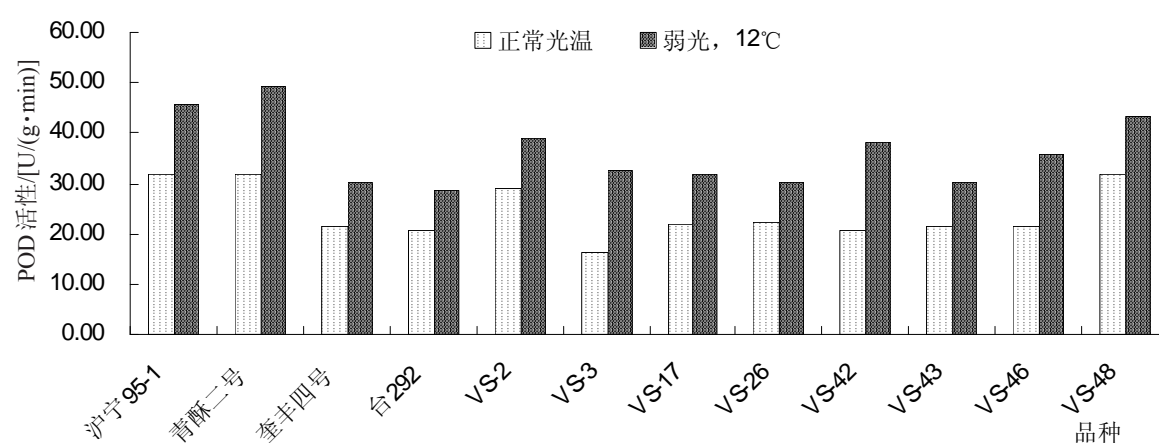


图4 菜用大豆叶片 POD 活性

‘青酥二号’和 VS-48 在低温弱光胁迫条件下,叶片的 POD 活性大于其他品种,说明 POD 活性可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的一个评价指标。

由图 5 可以看出,在低温弱光胁迫条件下,各菜用大豆品种叶片中 CAT 活性均增强,但仍以‘沪宁 95-1’、‘青酥二号’和 VS-48 等在低温弱光胁迫条件下,叶片的 CAT 活性增强最显著,表明菜用大豆品种‘沪宁

95-1’、‘青酥二号’、VS-48 的耐低温弱光性要强于其他品种,同时说明 CAT 活性可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的评价指标之一。

2.4 光温组合与菜用大豆叶片保护性酶活性的相关性分析

在本研究中,2 个光温组合条件下的菜用大豆从播种开始就一直处于恒温恒光条件下,因此,选取成活

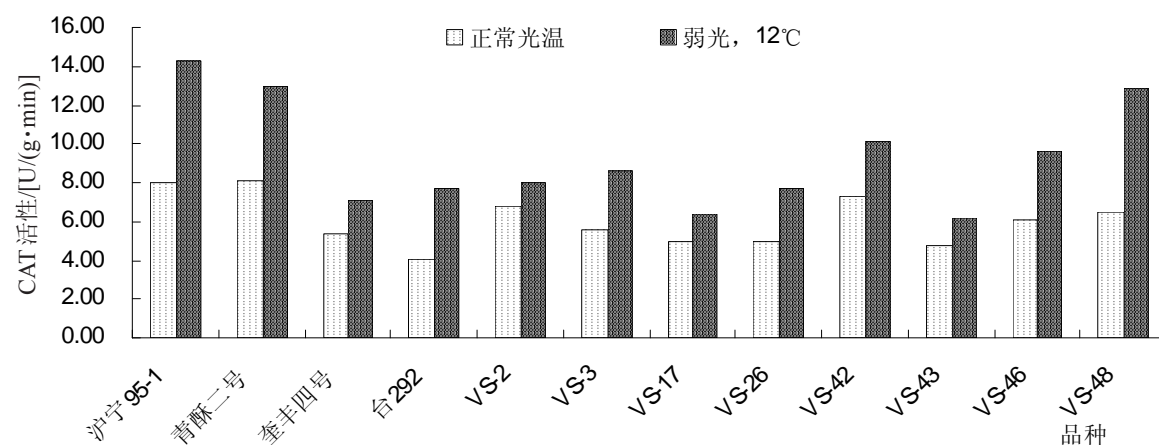


图5 菜用大豆叶片 CAT 活性图

株于第一出复叶期的叶片可以看作是成活株在不同光温组合条件下的恢复期。同时从表2可以看出,菜用大豆叶片SOD、POD、CAT活性与温度光照组合相关系数都大于0.8,呈极显著正相关。同时说明临界低温弱光条件会增强菜用大豆叶片SOD、POD、CAT活性。因此本研究进一步认为SOD、POD、CAT活性可以初步作为菜用大豆耐低温弱光鉴定方法和评价指标。

表2 光温组合与菜用大豆叶片保护性酶活性相关性分析

	SOD活性	POD活性	CAT活性
光温组合	0.975**	0.842**	0.837**

注:表中**表示相关性达到极显著($P < 0.01$)水平。

3 结论

(1)本研究结果表明,低温和弱光照胁迫条件会延长菜用大豆的种子发芽出苗时间、降低幼苗的存活率,但不同品种的抗性反应存在差异。在12个参试品种中,以‘沪宁95-1’在低温和弱光逆境胁迫条件下的出苗速度最快、幼苗存活率最高、抗性表现最强,其次是‘青酥二号’和VS-48,对低温和弱光逆境胁迫的抗性表现也相对较强,说明低温弱光逆境胁迫条件下种子发芽出苗速度和幼苗存活率可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的评价指标。

(2)本研究结果还表明,低温和弱光照胁迫条件会导致菜用大豆植株叶片中SOD、POD和CAT的活性增强,但不同品种的活性反应存在明显差异。笔者在研究中发现,在低温弱光条件下,菜用大豆品种‘沪宁95-1’、‘青酥二号’和VS-48的SOD、POD、CAT活性不但比正常光温条件下的SOD、POD和CAT的活性要强,而且比其他9个菜用大豆品种的SOD、POD和CAT的活性要强。说明低温弱光逆境胁迫条件下植株叶片中SOD、POD和CAT活性可以作为菜用大豆耐低温弱光性鉴定的评价指标。

(3)由于不同菜用大豆品种对低温弱光逆境胁迫的抗性反应不同,且存在差异。因此,通过对耐低温和耐弱光菜用大豆种质材料的鉴定筛选,结合杂交转育手段,可望选育出耐低温弱光性强的菜用大豆新品种。

4 讨论

4.1 选择压力

建立菜用大豆耐低温弱光品种的鉴定方法,首先应严格控制选择处理的温度、光照强度及处理时间。较长的恒定低温弱光处理时间,才能使材料间的耐性差异在观察的性状指标上真实反映出来。据毛爱军等^[10]

报道,在弱光下、15℃/5℃、处理10天是筛选甜椒耐低温弱光品种适宜压力。但是本试验对菜用大豆的耐低温弱光选择压力处于摸索阶段,所以选择恒温恒光作为选择菜用大豆耐低温弱光品种的鉴定压力条件。在弱光、恒定8℃处理条件下,12个菜用大豆品种出苗率为0%;而在弱光、恒定12℃处理条件下12个菜用大豆品种最高出苗率为50%;正常光照,恒定16℃处理下最低出苗率为53%,所以初步选择弱光,恒定12℃处理条件作为本试验最佳选择压力。

4.2 生理指标

低温下活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累是植物产生冷害的重要方面^[11],而超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(oxidase, POD)是植物体内主要的ROS酶促清除系统^[12]。前人已经比较了常温和低温胁迫下黄瓜叶片的抗氧化酶活性的差异^[13-15],但是在菜用大豆中常温和低温胁迫下叶片的抗氧化酶活性的差异研究尚未开展。本试验就是选择恒定光照温度处理菜用大豆作为选择压力条件。选用测定还原性保护酶活性的成活株第一出复叶期的叶片,它可以看作是成活株在不同光温组合条件下的恢复期,这表明菜用大豆在恒温恒光条件下已经由对低温弱光应急反应过渡到产生对低温弱光的抗性,这可能是由于SOD、POD、CAT保护酶的活性的耐寒机制已经形成,还原性保护酶的活性维持在较高水平,能够使活性氧代谢处于一定的平衡状态,避免了活性氧等各种自由基的大量积累,减轻了膜脂过氧化作用,降低了细胞膜的破坏程度,形成对低温弱光的抗性机制。

参考文献

- [1] 马丽萍,张彩英.菜用大豆的研究进展[J].河北农业科学,2001,5(3):53-57.
- [2] 韩立德,盖钧镒,邱家驹.菜用大豆荚粒品质发育过程及适宜采摘期分析[J].大豆科学,2003,22(3):202-207.
- [3] 颜清上,邵桂花.AVRDC的菜用大豆育种研究[J].大豆通报,2000(5):27-28.
- [4] 顾卫红,郑洪建,张燕,等.菜用大豆的国际需求及科研生产动态(综述)[J].上海农业学报,2002,18(2):45-48.
- [5] 何洁,刘鸿先,王以柔,等.低温与植物的光合作用[J].植物生理学通讯,1986(2):1-6.
- [6] Lyons J M, Raison J K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury[J]. Plant Physiol,1970,45(4):386-389.
- [7] Chen J F, Ren G, Yu J Z H, et al. Studies on performance of peroxidase isozyme in the progenies from selfing of backcross between *Cucumis × hytivus* and *C. sativus*[J]. Wuhan Botanical

- Research,2002,20(5):333-337.
- [8] 李合生.植物生理生化实验原理及技术[M].北京:高等教育出版社,2000:167-169.
- [9] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2000:154-155.
- [10] 毛爱军,耿三省.低温对甜椒生长发育的影响及甜椒耐低温筛选方法的研究[J].中国辣椒,2001(1):17-20.
- [11] 段伟,李新国,孟庆伟,等.低温下的植物光抑制机理[J].西北植物学报,2003,23(6):1017-1023.
- [12] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen Species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annul Rev Plant Bio*,2004,55:401-427.
- [13] 马德华,卢育华,庞金安.低温对黄瓜幼苗膜脂过氧化的影响[J].园艺学报,1998,25(1):61-64.
- [14] 周艳虹,喻景权,钱琼秋,等.低温弱光对黄瓜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J].应用生态学报,2003,14(6):921-924.
- [15] Lee D H, Lee C B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays [J]. *Plant Science*,2000,159(1):75-85.