

外源绿原酸对大豆下胚轴不定根形成的影响

刘江, 陈中说, 吴春, 吴海军, 张晨州, 陈建华, 邓俊才, 秦雯婷, 杨文钰*, 陈兴福*

四川农业大学农学院 农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室, 成都 611130

摘要:以大豆下胚轴为试验材料,研究了绿原酸(CGA)及其与植物生长调节剂(IAA、IBA)共同作用对大豆下胚轴不定根发生的影响。结果表明,当CGA施用量达到200 $\mu\text{mol/L}$ 及400 $\mu\text{mol/L}$ 时,大豆下胚轴生根率分别显著降低了17.8%和26.7%,平均根长分别显著降低了18.7%和35.4%;当植物生长调节剂施用量为2 $\mu\text{mol/L}$ 时,可显著缓解CGA(100 $\mu\text{mol/L}$)对大豆不定根的抑制作用,使其生根率分别提高12.5%和20.0%,随着生长素施用量的进一步增加(10~50 $\mu\text{mol/L}$),其生根率显著下降;大豆不定根培养24 h内,对照下胚轴基部木质素相对含量降低,CGA处理大豆的木质素相对含量升高。高浓度CGA对大豆不定根形成具有抑制作用,其通过与木质素、生长素的共同作用,实现对大豆不定根发生的调控。

关键词:绿原酸;大豆下胚轴;不定根;抑制

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.017

Effect of Exogenous Chlorogenic Acid on Adventitious Rooting of Soybean Hypocotyl

LIU Jiang, CHEN Zhong-shuo, WU Chun, WU Hai-jun, ZHANG Chen-zhou, CHEN Jian-hua,

DENG Jun-cai, QIN Wen-ting, YANG Wen-yu*, CHEN Xing-fu*

Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Southwest China,

College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: The effect of chlorogenic acid (CGA) and IAA/IBA on adventitious rooting of soybean hypocotyl was explored in this study. The results indicated that after treatment with 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$ CGA, rooting rate of soybean hypocotyl significantly decreased (17.8% and 26.7%, respectively), average root length significant decreased (18.7% and 35.4%, respectively); The inhibition effect of CGA on the adventitious rooting of soybean hypocotyl can be remitted by application of 2 $\mu\text{mol/L}$ IAA/IBA, their rooting rate improved significantly (12.5% and 20.0%, respectively); with the increasing doses of IAA/IBA applications (10~50 $\mu\text{mol/L}$), the rooting rate significant decreased. Lignin content of soybean hypocotyl decreased in the first 24 h after treatment. The lignin content of samples suffered from 100 $\mu\text{mol/L}$ CGA, increased inversely. High concentration of CGA treatment inhibited the growth of adventitious rooting of soybean. Low concentration of IAA/IBA treatment can remit the inhibition, high level of IAA/IBA treatment increased inhibition. In conclusion, CGA itself might not directly involve in organogenesis, but, might be related to a balance between IAA/IBA and lignin that control organogenesis of adventitious rooting in soybean hypocotyl.

Key words: chlorogenic acid; soybean; adventitious root; inhibition

绿原酸(CGA, chlorogenic acid)是植物次生代谢过程中产生的重要有机酸,广泛存在于多种植物中,也是大豆中含有的众多酚类物质之一^[1-3],其为植物有氧呼吸经莽草酸途径合成的一类苯丙素类化合物,与木质素的合成具有共同的代谢通路,二者均

是莽草酸途径的重要中间产物^[4]。已有研究表明,绿原酸除具有较好的抗氧化、抗炎等药用活性外,还具有类似植物内源激素的生理调控功能,其能通过抑制生长素氧化酶活性,防止生长素被降解。近年来, Franklin G等^[5]的研究指出,低浓度绿原酸可促进金丝桃芽、根及根毛的发生,高浓度则抑制该过程,当同时施加外源生长素(NAA, α -naphthaleneacetic acid)时,该抑制作用得到缓解; She XP等^[6]的研究表明,一定浓度绿原酸抑制了绿豆胚轴的 H_2O_2

收稿日期: 2015-08-24 接受日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31401329); 中国博士后科学基金面上项目(2014M560724)

* 通讯作者 Tel: 86-28-86290971; E-mail: chenxf64@sohu.com, mssiyangwy@sicau.edu.cn

形成,从而阻止了不定根的形成;Faivre-Rampant O 等^[7]的研究发现,在不生根的 *rac* 型和易生根的野生型烟草中,*rac* 型植株有较高的绿原酸含量,而生长素含量更高;对易生根的野生型植株施用 10^{-3} mol/L 绿原酸,其生根率从 100% 降到 0%。

绿原酸对植物根芽分化具有调控作用,然而其作用机理尚未完全阐述清楚,本研究以大豆下胚轴为试验材料,研究了外源绿原酸对大豆下胚轴不定根发生的影响,以期阐明其通过植物生长调节剂、木质素介导对大豆不定根形成产生影响的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以市售川产大豆为试验材料。绿原酸(CGA,纯度 $\geq 98\%$),购自西安开来生物有限公司(110753-201314);吲哚乙酸(IAA)和吲哚丁酸(IBA)购自成都市科隆化工试剂厂;乙酰溴、冰醋酸、高氯酸、氢氧化钠等试剂均为分析纯试剂。

1.2 试验设计

试验在不定根培养开始后实施各处理,处理时间为 24 h,处理完毕后,培养溶液换为蒸馏水;每个处理设置 15 株大豆下胚轴,5 株一组(水培杯),重复 3 组,于光照培养箱中随机摆放。

1.2.1 不同浓度外源 CGA 对大豆下胚轴不定根形成的影响

以 CGA 浓度为单因素变量,设置 0(蒸馏水对照)、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 等 6 个浓度梯度,重复 3 次,处理 24 h 后测定各项指标。

1.2.2 外源 CGA 与不同浓度植物生长调节剂对大豆下胚轴不定根形成的影响

以 CGA 和 IAA、IBA 浓度为两因素变量,CGA 设置 0(蒸馏水空白)和 100 $\mu\text{mol/L}$ 2 个水平,IAA、IBA 分别设置 0(蒸馏水空白)、2、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 等 4 个浓度梯度,IAA、IBA 分别有 8 个处理,重复 3 次,处理 24 h 后测定各项指标。

1.2.3 外源 CGA 对大豆下胚轴木质素积累的影响

以 100 $\mu\text{mol/L}$ CGA 处理大豆下胚轴,以蒸馏水为空白对照,从开始进行不定根培养时记为 0 h,依次在 0、24、48、72、96、120、144 h 取样,取样部位为基部以上 1.5 cm 处,5 株为一组,重复 3 次,采样后即刻液氮处理,-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存,待木质素测定。

1.3 试验方法

1.3.1 试验材料培养

取经挑选,大小一致的健康大豆,培养皿培养,定期浇水,于 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$,光照强度 4000 lx,光照/黑暗时长 16 h/8 h 的光照培养箱中培养 6 d 后,取长势一致的大豆幼苗为试验材料。用锋利刀片于大豆下胚轴 4 cm 处切除获得下胚轴,以水培杯定植诱导生根,5 株一组,按 1.2 试验设计实施处理,于光照培养箱中进行诱导生根。

1.3.2 测定项目和方法

各处理实施完成后即考察大豆下胚轴基部不定根数,以游标卡尺测量不定根根长。参照 Hatfield R^[8] 的方法,采用乙酰溴分光光度法,将所取鲜样(5 株 \times 1.5 cm 混合)液氮研磨、冻干处理后,准确称量 200 mg,以冰醋酸为空白对照,于 280 nm 下测定吸光度,以吸光度值计为木质素的相对含量。

1.4 数据分析

采用 Microsoft Excel 2013 整理数据, Sigma Plot 12.5 软件绘图;采用 SPSS 18.0 软件中的 Duncan's 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度外源 CGA 对大豆下胚轴不定根形成的影响

外源 CGA 对大豆下胚轴生根率、根长的影响如表 1 所示,低浓度(0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) CGA 对大豆下胚轴生根率未产生显著影响,超过一定浓度后其生根率显著降低;与空白对照相比,施加 25 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA,大豆下胚轴的生根率未发生变化,当 CGA 浓度提高到 100 $\mu\text{mol/L}$ 后,下胚轴生根率下降了 2.22%,但差异不显著;当 CGA 浓度提高到

表 1 CGA 浓度对大豆下胚轴生根的影响

Table 1 Effect of different concentrations of CGA on the rooting of soybean hypocotyl

CGA 浓度 CGA concentration ($\mu\text{mol/L}$)	生根率 Rooting rate (%)	平均根长 Average root length (cm)
0	95.56 b	0.771 b
25	95.56 b	0.841 b
50	95.56 b	0.779 b
100	97.78 b	0.700 ab
200	77.78 a	0.627 ab
400	68.89 a	0.498 a

注:同列数据后的不同字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。
Note: Values marked by different letters within the same column indicated significant difference ($P < 0.05$), same as below.

200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 后,与空白对照相比,其生根率分别降低了 17.78%、26.67%,差异达到显著水平。

由表 1 可知,低浓度(0~25 $\mu\text{mol/L}$)CGA 对大豆下胚轴不定根平均根长有一定的促进作用,当 CGA 浓度达到 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,与空白对照相比,不定根的平均根长增加了 0.07 cm,但差异不显著;随着施加浓度的进一步提高,平均根长降低,甚至表现出抑制作用,达到一定高浓度(≥ 100 $\mu\text{mol/L}$)后,该抑制作用达到显著水平,当浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,与空白对照相比,不定根的平均根长显著降低了 0.273 cm;较高浓度的 CGA(≥ 200 $\mu\text{mol/L}$)对大豆下胚轴不定根的发生具有明显的抑制作用。

2.2 外源 CGA 与不同浓度植物生长调节剂对大豆下胚轴不定根形成的影响

外源 CGA 与不同浓度 IAA、IBA 处理对大豆下胚轴不定根形成的影响,结果如表 2、表 3 所示。由表 2 可知,当 IAA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 处理使大豆下胚轴生根率显著降低了 11.11%,抑制了不定根的发生;在施加 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 IAA 后,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理相比,100 $\mu\text{mol/L}$ CGA 处理未降低下胚轴的生根率,这表明 IAA 的施加缓解了 CGA 的抑制作用。随着 IAA 浓度的升高,达到 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 时,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理相比,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 分别使下胚轴的生根率降低了 4.44% 和 8.89%,后者下降显著。这表明,随着 IAA 浓度的进一步提高,抑制作用加剧。

表 2 CGA 与不同浓度 IAA 对大豆下胚轴生根的影响
Table 2 Effect of different concentrations of CGA and IAA on the rooting of soybean hypocotyl

CGA 浓度 CGA concentration ($\mu\text{mol/L}$)	IAA 浓度 IAA concentration ($\mu\text{mol/L}$)	生根率 Rooting rate (%)	平均根长 Average root length (cm)
0	0	100.00 b	0.970 ab
0	2	100.00 b	1.120 b
0	10	100.00 b	0.917 ab
0	50	100.00 b	0.702 ab
100	0	88.89 a	0.904 ab
100	2	100.00 b	0.876 ab
100	10	95.56 ab	0.737 ab
100	50	91.11 a	0.541 a

随着 IAA 浓度逐步增高,在 0 $\mu\text{mol/L}$ CGA 处理组中,大豆下胚轴的生根率未发生明显变化。在 100 $\mu\text{mol/L}$ CGA 处理组中,下胚轴的生根率表现为先增后减的趋势,当 IAA 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,下胚

轴生根率显著提高了 11.11%,达到最高水平;当浓度进一步提高时,生根率逐步下降,当 IAA 浓度达到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,生根率下降幅度达到显著水平。这表明,外源施加 CGA 时,高浓度的 IAA 表现出对大豆下胚轴生根率的显著抑制作用。

表 3 CGA 与不同浓度 IBA 对大豆下胚轴生根的影响
Table 3 Effects of different concentrations of CGA and IBA on the rooting of soybean hypocotyl

CGA 浓度 CGA concentration ($\mu\text{mol/L}$)	IBA 浓度 IBA concentration ($\mu\text{mol/L}$)	生根率 Rooting rate (%)	平均根长 Average root length (cm)
0	0	95.56 b	0.727 c
0	2	93.33 b	0.914 d
0	10	80.00 b	0.668 c
0	50	91.11 b	0.464 b
100	0	77.78 b	0.671 c
100	2	93.33 b	0.647 c
100	10	80.00 b	0.420 ab
100	50	53.33 a	0.290 a

由表 3 可知,外源 CGA 与不同浓度 IBA 对大豆下胚轴不定根形成的影响规律与 IAA 基本一致。当 CGA 对大豆下胚轴生根表现出抑制作用时,较低浓度的 IBA 可缓解其抑制作用,但随着 IBA 浓度的进一步升高,该抑制作用加剧。

2.3 外源 CGA 对大豆下胚轴木质素积累的影响

大豆下胚轴诱导生根处理 0~120 h 内,其下胚轴木质素积累的动态变化情况如图 1 所示。由图 1 可知,大豆下胚轴不定根诱导发生 24 h 内,CGA 处理大豆下胚轴基部的木质素相对含量略有上升,而对照组(H_2O 处理)木质素相对含量略有下降。诱导生根 24 h 后,不同处理大豆下胚轴基部的木质素相对含量均呈上升趋势,而 CGA 处理组样本的上升幅度更大,并在 48 h 时达到峰值。这表明,在大豆不定根发生初期,CGA 的施加促进了其下胚轴基部

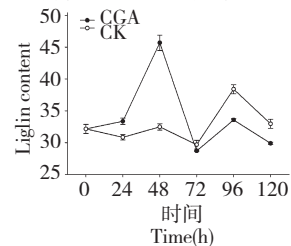


图 1 CGA 对大豆下胚轴木质素积累的影响

Fig. 1 Effects of CGA on the lignin accumulation of soybean hypocotyl

木质素的合成,并使其在 24 h 后呈现急剧上升趋势。

3 讨论

绿原酸是植物体内一类典型的多酚化合物,一方面其作为生长素保护剂,能抑制生长素氧化酶活性,防止生长素被降解^[9],从而促进植物不定根的发生;另一方面,绿原酸与木质素有共同的代谢通路,亦是木质素合成的重要中间产物,当外源施加高浓度绿原酸时,咖啡酰辅酶 A 的合成加剧,导致木质素积累量增加;而在不定根发生的诱导阶段,需要发生部位木质素含量降低,完成组织的再分化,从而使特定细胞获得分生能力,分生能力的获得则是不定根发生的关键前提^[10];在大豆下胚轴诱导生根培养 24 h 内,下胚轴基部的木质素含量逐步降低,而绿原酸处理的大豆材料,其木质素含量却呈现上升趋势,即可能是因为外源绿原酸的施加促进了木质素的合成^[11],继而导致大豆不定根发生受到抑制。本研究发现,当同时施加外源生长素时,绿原酸的抑制作用得到缓解,这与 Franklin G^[5] 等人的研究结果一致,绿原酸虽未直接对根芽分化起作用,但其通过生长素与细胞分裂素比例 (auxin/cytokinin) 的平衡,起到调控根芽分化的作用。

上述两方面调控过程可通过下图加以解析,如图 2 所示,低浓度绿原酸作为生长素的保护剂,促进生长素的积累,从而促使根系发育;而高浓度的绿原酸使木质素合成加剧,并在发根部位积累,导致不定根发生受阻。

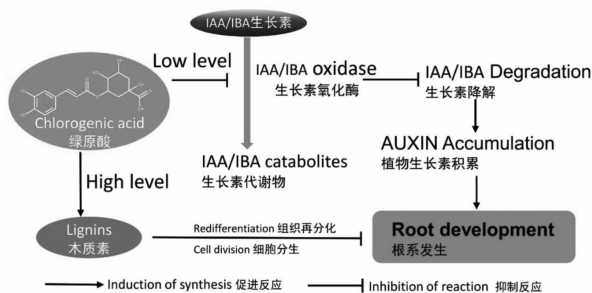


图 2 绿原酸调控大豆下胚轴不定根发生的代谢机理

Fig. 2 Hypothetical metabolic mechanism of chlorogenic acid regulate the adventitious rooting of soybean hypocotly

本研究基于大豆生理表型进行了分析讨论,而其分子生化证据还有待补充,下一步将开展生长素、木质素与绿原酸生物合成等相关重要环节的分子生化验证工作,以求进一步完善其调控机理。

4 结论

高浓度外源绿原酸对大豆下胚轴不定根形成具有抑制作用;低浓度生长素可缓解绿原酸对大豆生根的抑制作用,但高浓度则加剧该抑制作用。绿原酸通过平衡大豆不定根形成诱导期木质素与生长素的合成代谢,共同实现对大豆不定根发生的调控。

参考文献

- 1 Chung IM, Seo SH, Ahn JK, *et al.* Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chemistry*, 2011, 127: 960-967.
- 2 Xu B, Chang SK. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 7165-7175.
- 3 Xu B, Chang SK. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 8365-8373.
- 4 Humphreys JM, Chapple C. Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 224-229.
- 5 Franklin G, Dias AC. Chlorogenic acid participates in the regulation of shoot, root and root hair development in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49: 835-842.
- 6 She XP, Huang AX, Ren Y. Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase involved in adventitious root formation in mung bean hypocotyl cuttings. *Aust J Bot*, 2010, 58: 656-662.
- 7 Faivre-Rampant O, Charpentier JP, Kevers C, *et al.* Cuttings of the non-rooting rac tobacco mutant overaccumulate phenolic compounds. *Funct Plant Biol*, 2002, 29: 63-71.
- 8 Hatfield R, Fukushima RS. Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Science*, 2005, 45: 832-839.
- 9 Ke YQ (柯玉琴), Pan TG (潘廷国). Effects of NaCl stress on seedling growth and IAA metabolism of sweet potato and its relation to salt-tolerance. *Chin J Appl Ecol (应用生态学报)*, 2002, 13: 1303-1306.
- 10 Hatzilazarou SP, Syros TD, Yupsanis TA, *et al.* Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and *ex vitro* rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 827-836.
- 11 Escamilla-Trevino LL, Shen H, Hernandez T, *et al.* Early lignin pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Mol Biol*, 2014, 84: 565-576.