

土壤水分胁迫对大豆体内 酶活性和膜透性的影响^{*}

董 钻 谢甫绵

(沈阳农业大学, 沈阳 110161)

提 要

以年降水量差异较大的3个地区的3个大豆品种为试材,比较研究了旱境条件下其体内硝酸还原酶、固氮酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶的活性,以及丙二醛含量和相对电导。结果表明,长期在多雨条件下种植的丹豆8号的抗旱性较弱,而来自降水量中等或少雨地区的辽豆10号和建平黄豆则相对比较抗旱。大豆品种的抗旱性不能根据某单一生理指标加以评判。

关键词 大豆;水分胁迫;酶活性;膜透性

在干旱胁迫下,大豆体内代谢常发生紊乱,过氧化物酶活性的提高,可以起到保护细胞质膜的作用。不同抗旱类型的大豆品种的幼苗,在发生渗透胁迫时,其体内过氧化物酶活性增强的幅度是不同的(刘丽君等,1987)。水分胁迫会降低大豆固氮酶活性(Patterson等,1979;Vu, J. Cu, V等,1987)。干旱后恢复浇水,大豆的固氮酶活性即恢复到正常水平,甚至超过正常水平(Bennett等,1984)。

水分胁迫不仅增加膜的透性,而且影响膜脂的组成。抗旱大豆的棕榈酸和磷脂酰甘油含量明显高于不抗旱大豆,而亚麻酸和某些磷脂含量却低于不抗旱大豆;抗旱大豆线粒体膜脂的总脂肪酸不饱和度显著低于不抗旱大豆(尹田夫等,1990;Flavia Navari-Izzo等,1990)。

为了进一步探讨大豆品种的抗旱机理,我们选用来自降水量差异较大地区的3个主栽品种,进行干旱处理试验,测定了各品种受旱后体内酶活性、氧自由基含量和细胞质膜透性与品种抗旱性的关系。

* 本文于1995年6月6日收到。

This paper was received on June 6, 1995.

材料和方法

一、试材及试材培养

供试大豆品种为丹豆 8 号、辽豆 10 号和建平黄豆。这 3 个品种分别来自年降水量差异较大的 3 个地点,即丹东(多年平均降水量 1027.5mm)、沈阳(738.5mm)和朝阳(493.0mm)。

1. 盆栽断水试验

为了控制土壤水分,采用了盆栽试验。每盆盛土 12.5kg,每盆定苗 2 株。对照处理通过浇水使土壤含水量在全生育期内始终保持在 21—22%;干旱处理则在幼苗期(V_5)、始花期(R_1)和始粒期(R_5)通过断水,使土壤含水量控制在 8—9%。每期处理 4 盆,1 周后,2 盆用于测定分析,另 2 盆恢复浇水,与对照一起留待成熟时收获考种。

2. 渗透胁迫试验

从正常管理的盆栽植株中取相同叶位(第 8 复叶)的叶片,用打孔器(直径为 1.05cm)打成小圆片,然后按试验设计进行聚乙二醇(PEG6000)不同浓度的渗透胁迫漂浮试验。每盆漂浮液均为 200ml,漂浮小圆片 100 片,重复 3 次。设 4 个处理,处理 1:蒸馏水;处理 2:5%PEG6000 (-0.0376Mpa);处理 3:15%PEG6000 (-0.3132Mpa);处理 4:25%PEG6000 (-1.1860Mpa)。以上处理均漂浮 5 天,尔后测定其生理参数。

二、测定方法

1. 硝酸还原酶(NR)和过氧化氢酶(CAT)活性分别采用亚硝酸态氮含量法和放氧法测定。

2. 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)测定:称取 0.5g 试样,置于冰浴中的研钵内,加入适量 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH7.8),慢速研磨,定容至 5ml 刻度试管中,在 12000rpm 下离心 20 分钟,上清液供测定 SOD 和 MDA 用。

测定 SOD 总活性采用 NBT(氯化硝基四氮唑蓝)光化还原法。

测定 MDA:吸取 1.5ml 上清液,加入 2.5ml 5%硫代巴比妥酸的 5%三氯乙酸溶液,于沸水浴中加热 10 分钟,迅速冷却,于 3000rpm 下离心 10 分钟。取离心后的上清液在 534 和 600nm 波长下测定光密度。

3. 过氧化物酶(POD)测定:称试材 1g,加 5ml pH5.0 醋酸缓冲液,磨匀后在 4000rpm 下离心 15 分钟,上清液即酶液。反应液中加 pH5.0 醋酸缓冲液 1ml,0.1%愈创木酚 1ml,1ml 0.08% H_2O_2 和 1ml 酶液,反应 1 分钟后加 2ml 20%三氯乙酸中止反应,在 4000rpm 下离心 10 分钟,以蒸馏水代替 0.08% H_2O_2 作对照,测定 OD470。

4. 氧自由基含量测定:称取鲜叶片 5g,用 6ml 50mM 磷酸缓冲液(pH7.8)研磨,经四层纱布过滤,滤液在 4000rpm 下离心 10 分钟。取上清液 1ml 加入磷酸缓冲液 0.9ml 和 10mM 盐酸羟胺 0.1ml,在 25℃下混合并培养 20 分钟,取 0.5ml 培养液,依次加入 0.5ml 17mM 对氨基苯磺酸和 0.5ml 17mM α -萘胺,在 25℃下反应 20 分钟,反应后的显色液用同体积乙醚充分摇匀,于 3500rpm 下离心 5 分钟,吸取部分粉红色的水相,用磷酸缓冲液作空白,测定 OD530。

5. 固氮活性:采用间接法,即通过测定酰脲含量来判断固氮活性的高低。称取 0.5g 烘干后的根瘤样,加入 10ml 50%(v/v)乙醇的 0.1M 磷酸钾缓冲液(pH7.0)于 80℃ 水浴于萃取 5 分钟,以 3000rpm 离心 15 分钟,取上清液,按照徐志伟等(1986)的方法测定酰脲(OD535)。

6. 质膜透性采用电导率仪法测定。

结果与分析

一、干旱对大豆体内几种酶活性的影响

1. 硝酸还原酶

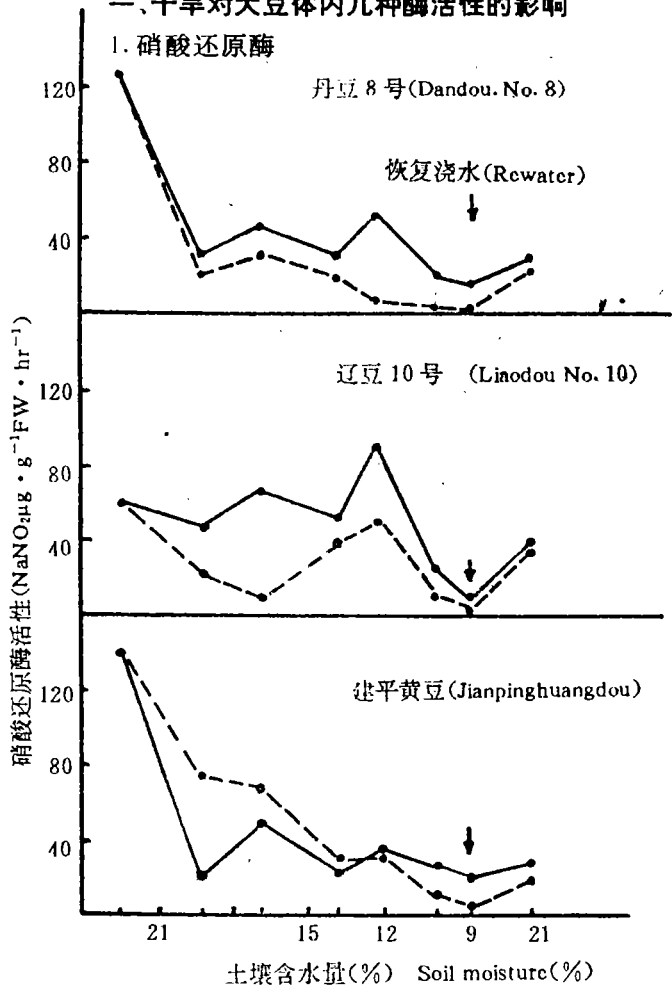


图 1 V₅ 期不同土壤含水量下大豆叶片硝酸还原酶活性的变化(1992)
· · · 对照, ——— 处理

Fig. 1 Changes of NR activity in soybean leaves under different soil moisture at V₅ stage
· · · ck, ——— drought treatment

硝酸还原酶活性的高低,是大豆植株体内氮代谢水平的一种反映。幼苗期,硝酸还原酶活性随着土壤含水量下降而减弱(图 1)。丹豆 8 号硝酸还原酶相对活性的下降速率和下降幅度比辽豆 10 号和建平黄豆快且大。辽豆 10 号硝酸还原酶相对活性变化幅度较小。建平黄豆在土壤含水量较高时,硝酸还原酶相对活性随土壤含水量降低有所升高,当土壤含水量低于 12% 时,活性急剧下降。这一动态可能与建平黄豆长期在干旱条件下种植,适应了较低的土壤含水量有关。当土壤含水量降至 8.65% 后恢复浇水,使土壤含水量增加到 21.28% 时,3 个品种的硝酸还原酶活性仍比对照低:丹豆 8 号、辽豆 10 号和建平黄豆分别比对照低 17.27%、6.14% 和 33.68%。由此可见,即使水分胁迫解除,硝酸还原酶活性仍恢复不到未受旱时的水平。

为了查明不同生育时期水分胁迫对硝酸还原酶的影响,我们在 V₅、R₁ 和 R₅ 等 3 个时期对

大豆植株进行了干旱处理,1 周后测定其硝酸还原酶活性的变化(图 2)。从图中可以看出,不论什么大豆品种,也不论什么生育时期,遇旱都会使硝酸还原酶活性大大降低。 V_5 和 R_1 期,辽豆 10 号和建平黄豆的硝酸还原酶活性均比丹豆 8 号高,但 R_5 期丹豆 8 号的硝酸还原酶活性却高于辽豆 10 号和建平黄豆。就硝酸还原酶的相对活性来看,不同生育时期干旱,辽豆 10 号的硝酸还原酶活性下降幅度较小,表现出较高的抗旱性。相反,丹豆 8 号下降幅度较大,这可能与该品种长期在湿润条件下种植有关。

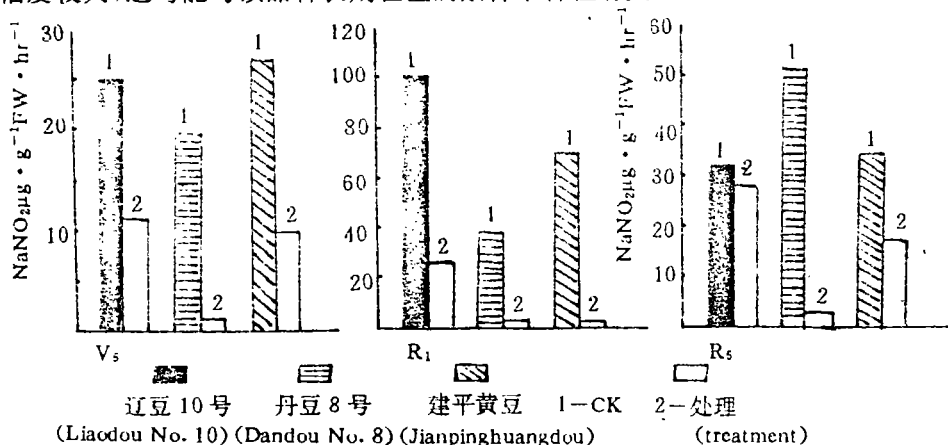


图 2 不同生育阶段干旱处理对大豆叶片硝酸还原酶活性的影响

Fig. 2 Effects of drought treatments at different growing stages on NR activities of soybean leaves

2. 固氮酶

大豆根瘤固氮酶活性与酰胺含量呈极显著正相关。因此,通过测定酰胺含量可以判断根瘤的固氮活性。本测定结果表明, R_1 期和 R_5 期进行干旱处理使根瘤固氮活性显著下降;但是不同品种固氮酶活性下降的幅度不同。 R_1 期受旱后,固氮酶活性下降的顺序是:丹豆 8 号(75.94%)>建平黄豆(22.06%)>辽豆 10 号(18.47%); R_5 期受旱则为:建平黄豆(80.06%)>丹豆 8 号(74.86%)>辽豆 10 号(66.32%)。植株受旱时酰胺含量下降,可能是土壤缺水造成根瘤本身含水量降低,因而根瘤固氮作用受到抑制的缘故(表 1)。

3. 保护酶系统

当大豆植株受到水分胁迫时,体内会产生自由基,使细胞质膜受损伤,而超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等则有清除自由基的作用。我们测定了大豆不同生育时期干旱处理后叶片内 SOD、CAT 和 POD 的变化(表 2)。

表 2 资料表明,不论什么时期干旱均使大豆叶片中 SOD 活力下降; V_5 期下降幅度大些, R_1 期小些, R_5 期下降幅度最小。 V_5 、 R_1 和 R_5 等 3 个时期受旱,大豆叶片中 CAT 活性均呈下降趋势;辽豆 10 号在 V_5 和 R_5 期约下降一半;丹豆 8 号在 V_5 和 R_1 期约下降 1/3;建平黄豆下降幅度较小。POD 活性在 V_5 和 R_1 期受旱后增强,而在 R_5 期则减弱。

表 1 不同生育时期干旱对大豆根瘤脲含量的影响(OD₅₃₅) (1992)

Table 1 Effects of drought treatments at different growing stages on ureide contents in soybean nodules (OD₅₃₅)

干旱时期 Stages	对照 CK	干旱处理 Treatment	比对照下降率(%) Decrement percentage(%)
丹豆 8 号 Dandou No. 8			
R ₁	4.293	1.033	75.94
R ₅	2.387	0.600	74.86
辽豆 10 号 Liaodou No. 10			
R ₁	0.720	0.587	18.47
R ₅	2.613	0.880	66.32
建平黄豆 Jianpinghuangdou			
R ₁	3.173	2.473	22.06
R ₅	1.640	0.327	80.60

* 脲含量以光密度值(OD₅₃₅)表示。

表 2 不同生育时期干旱对大豆体内保护酶系统的影响(1992)

Table 2 Effects of drought treatments at different growing stages on SOD, CAT and POD activities in soybeans(1992)

干旱时期 Stages	SOD(unity ⁻¹ FW)			CAT(m10 ₂ g ⁻¹ min ⁻¹)			POD (OD470g ⁻¹ FWmin ⁻¹)		
	CK	处理	±%	CK	处理	±%	CK	处理	±%
	CK	Treatment		CK	Treatment		CK	Treatment	
丹豆 8 号 Dandou No. 8									
V ₅	1387.7	877.0	-36.8	36.08	24.18	-33.0	0.440	0.450	+2.3
R ₁	423.5	325.0	-23.3	44.58	30.68	-31.2	0.140	0.160	+14.3
R ₅	156.5	139.6	-10.7	16.50	15.58	-5.6	0.150	0.140	-6.7
辽豆 10 号 Liaodou No. 10									
V ₅	1138.7	630.7	-44.6	82.29	35.37	-57.0	0.380	0.840	+121.1
R ₁	354.9	191.6	-46.0	49.46	39.70	-19.7	0.176	0.180	+2.3
R ₅	238.2	213.0	-10.6	20.68	10.42	-49.6	0.150	0.130	-13.3
建平黄豆 Jianpinghuangdou									
V ₅	1600.6	1074.4	-32.9	37.99	34.06	-10.3	0.390	0.950	+143.6
R ₁	414.5	320.9	-22.6	43.65	37.67	-13.7	0.200	0.220	+10.0
R ₅	453.5	407.9	-10.2	10.95	9.52	-13.1	0.150	0.140	-6.7

从不同品种的反应来看,丹豆 8 号在 V₅、R₁ 和 R₅ 期遇旱,其叶片中的保护酶系统活性变化幅度比较小些,这意味着体内自由基清除少些,植株组织受伤重些。

辽豆 10 号在 V₅ 期遇旱,SOD、CAT 活性减弱幅度较大,POD 活性增强幅度很大,说明该品种在 V₅ 期遇旱,其体内所产生的自由基被清除的可能性大些,细胞质膜受损伤的可能性小些。R₁ 期干旱,辽豆 10 号受害比较重,这表现在,SOD 活性减弱幅度较大,POD 增强幅度小。其结果是,植株体内组织受损伤较重,减产幅度也较大。R₅ 期受旱,辽豆 10 号叶片内 SOD 活性减弱程度虽不太大,但 POD 活性却减弱了,这样势必造成组织伤害。

建平黄豆在 V₅ 期受旱,其叶片中的保护酶系统活性变化幅度较大,体内因水分胁迫诱生的自由基可能较多地被清除,因而 V₅ 期受旱后减产较少(−13.6%)。但是,R₅ 期受旱,建平黄豆叶片中保护酶系统活性变化幅度较小,自由基清除不可能太多,最终造成大幅度的减产(−51.1%)。

二、干旱对细胞质膜的伤害

当植物器官因干旱胁迫遭受伤害时,其脂质常发生过氧化作用而产生丙二醛。丙二醛含量越高,表明细胞质膜伤害越重。

逆境伤害往往造成细胞内的物质(尤其是电解质)外渗,从而引起组织浸泡液的电导率增长。根据组织浸泡液的相对电导率可以判断膜受损的程度。逆境胁迫还引起体内各种自由基含量上升,进而扰乱体内代谢,破坏细胞结构。为了探讨不同时期干旱对大豆的伤害,我们测定了叶片的丙二醛、相对电导和氧自由基的状况(表 3)。

表 3 不同生育时期干旱对大豆叶片丙二醛、相对电导和 O₂^{•−} 的影响(1992)

Table 3 Effects of drought treatments at different growing stages on MDA, relative conductivity and O₂^{•−} in soybean leaves(1992)

干旱 时期 Stages	丙二醛(nmolg ^{−1} FW) MDA (nmolg ^{−1} FW)			相对电导 Relative conductivity(%)			O ₂ ^{•−} (μmolg ^{−1} FW)		
	CK	处理	增长率(%)	CK	处理	增长率(%)	CK	处理	增长率(%)
	CK	Treatment	Incr. (%)	CK	Treatment	Incr. (%)	CK	Treatment	Incr. (%)
	丹豆 8 号			Dandou No. 8					
V ₅	54.5	66.5	22.02	7.84	8.53	8.80	—	—	—
R ₁	27.4	40.4	47.45	11.94	19.54	63.65	0.706	2.079	194.38
R ₅	60.5	103.2	70.58	15.73	19.79	25.81	0.542	1.502	177.18
辽豆 10 号			Liaodou No. 10						
V ₅	56.7	68.8	21.34	8.89	9.03	1.57	—	—	—
R ₁	35.2	37.4	6.16	10.95	15.44	41.00	0.937	2.438	150.51
R ₅	76.6	118.7	55.02	13.46	18.23	35.44	0.848	1.077	27.04
建平黄豆			Jianpinghuangdou						
V ₅	53.2	54.8	3.01	9.37	9.41	0.43	—	—	—
R ₁	27.6	31.2	13.04	11.68	15.22	30.31	0.954	2.866	199.24
R ₅	55.4	66.8	20.58	15.60	18.81	20.58	1.145	3.497	205.46

从表 3 可以看出,大豆生育的 V₅、R₁ 和 R₅ 期干旱均会造成叶片中丙二醛含量增加、膜的相对电导率增强以及氧自由基增多。概括地说,丹豆 8 号的这 3 个指标均高于辽豆 10 号和建平黄豆。这表明,丹豆 8 号的叶片膜系统受损伤更严重些。建平黄豆的氧自由基增长率较高,说明其对膜系统冲击也很重。比较而言,丹豆 8 号的抗旱性弱些,辽豆 10 号和建平黄豆抗旱强些。另外,我们采用不同浓度的聚乙二醇(PEG)模拟不同渗透胁迫,并测定了不同品种叶片中丙二醛的含量。结果证明,丹豆 8 号在轻度渗透胁迫(−0.0376Mpa)下,丙二醛便急剧升高,以后随着渗透胁迫的增强,丙二醛含量稍有增加。而辽豆 10 号随着渗透胁迫增加,丙三醛增长比较平缓(图 3)。

我们采用同样的方法测定了不同渗透胁迫强度下相对电导率的变化。在渗透胁迫强度不大时,丹豆 8 号的相对电导率上升缓慢,而当渗透胁迫强度超过 -0.3132Mpa 时,相对电导率急剧上升,表明其细胞质膜已严重损伤。辽豆 10 号的反应则一直比较平稳(图 4)。

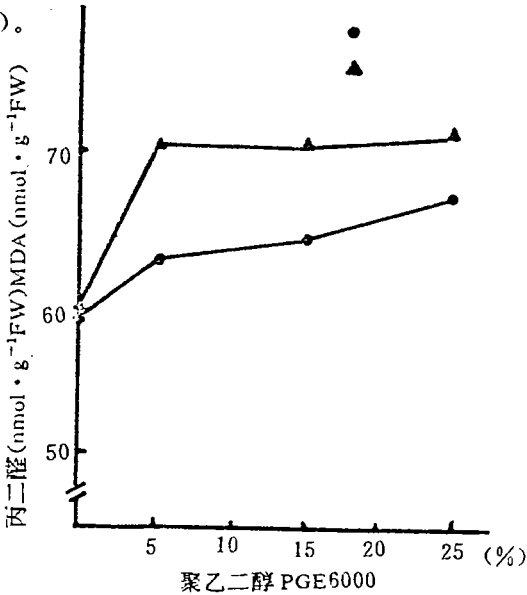


图 3 不同渗透胁迫下大豆叶片
中丙二醛的变化(1992)

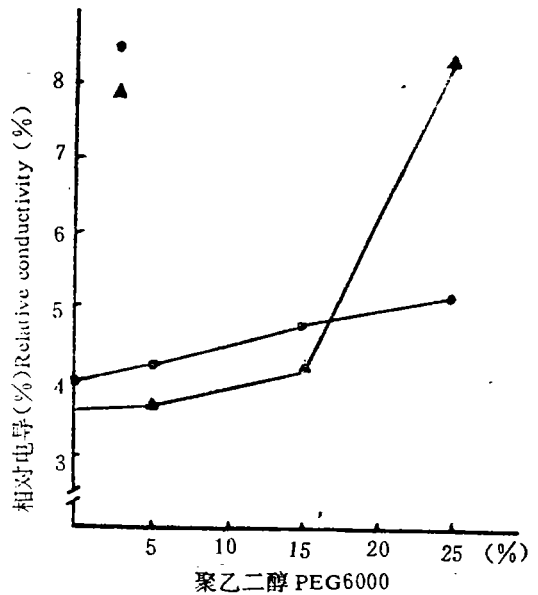


图 4 不同渗透胁迫下大豆叶片
相对电导的变化(1992)

Fig 3 Changes of MDA contents in soybean leaves under different osmotic stresses (1992) Fig 4 Changes of relative conductivity in soybean leaves under different osmotic stresses (1992)

讨 论

1. 关于生物自由基与植株抗旱性问题

在正常情况下,植株体内自由基的产生和清除处于动态平衡状态。在植株遭受干旱胁迫时,体内自由基增多。当超过了伤害“阈值”,膜脂中的多不饱和脂肪酸双键在自由基冲击下便发生过氧化作用;过氧化过程又会产生新的自由基,进而更促进膜脂的过氧化,使膜的完整性更遭破坏。本试验结果表明,大豆受旱后体内氧自由基大为增加,体内保护酶活性下降,结果导致膜脂质过氧化,丙二醛积累,膜透性增强。

2. 关于干旱对细胞膜透性的影响问题

在水分胁迫条件下,细胞膜受损后,大豆组织的外渗电解质百分含量与其水势呈高度负相关。不同大豆品种在干旱条件下的外渗电解质数量是不同的。同一品种在不同生育时期膜受损的程度也不一致(宋英淑等,1985;刘丽君等,1986)。

大豆叶片的渗透势会影响细胞膜的稳定性,蔗糖和钾是渗透势的主要调节者,增施氮肥可以提高叶片组织和细胞汁液中的溶质浓度,但叶片水势并不受高施氮量的影响(Premachandra 等,1990)。

李锦树等,(1983)对玉米的研究表明,叶片质膜透性随渗透胁迫的增强而增大;复水后透性又可不同程度地恢复。植株干旱失水时,细胞内水势降低,膜系统中的水分子间隙和氢键定位都会发生变化,可能使膜蛋白质变构和膜脂呈有序排列而导致质膜半透性改变,相对透性增大。在水分胁迫下,丙二醛含量随胁迫强度的增强而上升。丙二醛含量的增加与膜透性的增大呈显著的正相关(蒋明义等,1991)。

本研究表明,大豆叶片膜透性的变化可以很好地反映组织受水分胁迫冲击的程度,并且,丙二醛含量的增加先于膜透性的增大。

3. 关于不同大豆品种抗旱性差异问题

本项试验研究表明,来源于年降水量不同地区的大豆品种,其抗旱能力是有差异的。受旱后,它们体内酶活性的变化和膜伤害程度各不相同。丹豆 8 号适于在雨水较充沛的地区种植,遇旱后体内酶活性变幅较大,膜受伤害较重。相对地说,辽豆 10 号和建平黄豆对水分胁迫的抵抗力较大,受伤害较轻。

不同大豆品种抗旱性的差异也表现在固氮酶活性对干旱的反应上。在本试验中, R_1 期干旱,各品种固氮酶活性下降的顺序是丹豆 8 号>建平黄豆>辽豆 10 号,而 R_5 期干旱,下降顺序则为建平黄豆>丹豆 8 号>辽豆 10 号。

不同大豆品种的抗旱机制可能不完全相同,大豆的抗旱性是由众多因子决定的,我们不宜就某一个生理参数来判断品种的抗旱性,而应根据众多参数进行综合评判。

参考文献

- [1] 宋英淑等,1986,过氧化物酶活性与大豆抗旱的关系,黑龙江农业科学,(1),41—44
- [2] 刘丽君等,1987,渗透胁迫对大豆幼苗过氧化物酶活性及脯氨酸含量的影响,大豆科学,6(3):221—224
- [3] 尹田夫等,1990,抗旱与不抗旱大豆叶线粒体膜脂脂肪酸和磷脂组成比较,大豆科学,9(1):19—24
- [4] 宋英淑等,1985,不同品种大豆的产量及质膜透性对水分胁迫的反应,大豆科学,4(4):279—284
- [5] 刘丽君等,1986,根际干旱对大豆幼苗细胞质膜相对透性及生物产量的影响,大豆科学,5(2):117—122
- [6] 蒋明义等,1991,水分胁迫与植物膜脂过氧化,西北农业大学学报,19(2):88—94
- [7] 李锦树等,1983,干旱对玉米叶片细胞透性及膜脂的影响,植物生理学报,9(3):223—229
- [8] Bennett, J. M. et al., 1984, Drought and flooding effects on N_2 fixation, Water relation, and diffusive resistance of soybean. *Agronomy Journal*, 76:735—740
- [9] Flavia Navari-Izzo, et al., 1990, Lipids of soybean and sunflower seedling grown under drought conditions. *Phytochemistry*, 29(7):2119—2123
- [10] Patterson, r. P. et al., 1979, Growth and specific nodule activity of soybean during application and recovery of leaf moisture stress. *Plant Physiol.*, 64:551—556
- [11] Premachandra, G. S. et al., 1990, Cell membrane stability, an indicator of drought tolerance, as affected by applied nitrogen in soybean. *Journal of Agricultural Science*, 115:63—66
- [12] Vu, J. C. V. et al., 1987, Drought stress and elevated CO_2 effects on soybean ribulose biphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates. *Plant Physiol.*, 83:573—578

EFFECTS OF DROUGHT TREATMENTS AT DIFFERENT STAGES ON THE ENZYME ACTIVITIES AND MEMBRANE PERMEABILITIES IN SOYBEANS

Dong Zuan Xie Futi

(*Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161*)

Abstract

The activities of enzymes such as nitrate reductase (NR), nitrogenase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD), and the malonaldehyde (MDA) contents and the relative conductivities were studied under drought stress treatments at different development stages with three soybean varieties from three different districts with large difference in annual rainfall. The results showed that Dandou No. 8, planted in plentiful rainfall district for a long time had weak resistance to drought, however, Liaodou No. 10 and Jianpinghuangdou, from regions with moderate or deficient rainfall, had relatively strong resistance to drought. Soybean drought resistance couldn't be estimated only by one physiological parameter.

Key words Soybean; Drought stress; Enzyme activities; Membrane permeabilities