

大豆感染 SMV₃ 后多酚类物质的变化分析*

栾晓燕 陈怡 杜维广 满为群 张桂茹 刘鑫磊

(黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨, 150086)

摘要 以对 SMV₃ 抗性不同的四个大豆品种(系)为材料, 分析其感染 SMV 后各生育阶段的总多酚和总黄酮的含量及变化。结果表明: 抗感病品种未接种健株中总黄酮、总多酚含量, 抗病品种明显高于感病品种, 接种 SMV₃ 后总黄酮、总多酚含量抗病品种变化不大, 感病品种两指标含量明显提高, 二者动态变化也明显不同。抗感病品种类黄酮配基组成相同, 接种 SMV₃ 后, 感病品种增加了 P₃ 配基, 部分缺少了 P₄ 配基。大豆中总黄酮、总多酚的动态变化及黄酮配基的组成与增减均可作为鉴定抗感病品种的生化指标。

关键词 大豆花叶病毒; 成株抗性; 总多酚; 总黄酮

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2003)03-0186-04

0 前言

酚类物质是植物重要的次生代谢物质, 它参与许多生理过程, 如氧化还原、木质化形成、刺激反应和对毒素活性的反应, 其在植物抗病过程中的重要作用已得到证实^[1-3]。张军等研究了大豆在 SCN₃ 侵染过程中多酚类物质的表达情况, 提出了多酚的动态变化与抗性的关系。滕冰等研究证实了大豆感染 SMV 后产生的种粒斑驳是由黄酮类化合物组成的, 种皮中类黄酮配基的组成和含量变化与种粒斑驳的抗性相关。但在大豆对 SMV 成株抗性方面未见有此类报道。本研究在株系水平上, 在人工接种条件下, 分析了不同抗性大豆感染 SMV₃ 后各生育阶段叶片总多酚和总黄酮的含量及变化, 为进一步揭示大豆对 SMV₃ 成株抗性生理机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

感病品种合丰 25、黑农 16, 抗病种质哈 91R3-184、哈 91R3-301, 上述品种在多年接种鉴定试

验中表现了稳定的抗感反应。

1.2 供试毒源

SMV₃ 株系由东北农业大学大豆研究所提供。

1.3 试验设置

试验设置在黑龙江省农科院大豆所防虫网室内, 采用盆栽播种, 每盆 3 株, 3 次重复, 于真叶期采用人工汁液摩擦法接种 SMV₃ 号株系(87-44 毒株), 并以未接种健株为对照, 分别在 R₁、R₃、R₅ 期取植株的同部位叶片测定总多酚、总黄酮及配基的含量。

1.4 试验方法

参照滕冰的总多酚、总黄酮及类黄酮苷元的分析方法并有所改进^[3,5]。

称取大豆叶片 2.0g, 加石英砂、CH₃OH 研磨、过滤、定容至 50ml。取样品液加入固兰 B 试剂, 多酚类化合物呈红色, 于 508nm 比色, 并从相同方法制得的标准曲线算出总多酚含量。取样品液减压蒸去 CH₃OH, 加石油醚萃取, 加入 Zroch 试剂, 过滤后比色测定。用 400nm 吸光度代入回归方程, 求得每克叶片(鲜)的总黄酮含量。取样品液蒸去 CH₃OH, 经石油醚萃取, 再经异戊醇萃取, 离心, 点样 1/4 于 TLC 板上, 展开后在 360nm 光下比色, 用 TLC 扫描测定类黄酮配基的含量。

* 收稿日期: 2003-04-07

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目。

作者简介: 栾晓燕(1964-), 女, 副研究员, 从事大豆遗传育种及光合生理生态研究。

2 结果与分析

2.1 不同抗性品种感染SMV后各生育阶段总多酚的变化

抗病种质与感病品种未接种健株在R₁期总多酚含量存在明显差异,抗病种质高于感病品种,说

明总多酚含量与品种的抗性有关。接种SMV后,抗感病品种总多酚含量均有增加,感病品种增加幅度大于抗病品种,高达129.02%。R₃时期,感病品种接种后,总多酚含量比对照高,抗病品种则略有增加。到R₅期,抗感病品种都较对照含量降低(表1)。

表1 不同抗性大豆感染SMV后各生育阶段总多酚的含量变化

Table 1 Change of total polyphenol content of soybean with different resistance to SMV at growing stages (mg/g, O. D508)

品种名 Variety	R ₁		R ₃		R ₅	
	总多酚 Total polyphenol		总多酚 Total polyphenol		总多酚 Total polyphenol	
	mg/g	±%	mg/g	±%	mg/g	±%
合丰 25 In. Hefeng25 In.	1.649	129.02	1.514	42.29	1.585	-20.31
合丰 25 CK Hefeng 25 CK	0.720	—	1.064	—	1.989	—
黑农 16 In. Heinong16 In.	1.672	109.00	1.588	26.53	1.698	-12.43
黑农 16 CK Heinong16 CK	0.800	—	1.255	—	1.939	—
哈 91R ₃ -184 In. Ha91R ₃ -184 In.	2.084	24.12	2.704	4.8	2.273	-5.41
哈 91R ₃ -184 CK Ha91R ₃ -184 CK	1.679	—	2.580	—	2.403	—
哈 91R ₃ -301 In. Ha91R ₃ -301 In.	1.620	17.57	2.182	2.11	1.790	-3.97
哈 91R ₃ -301 CK Ha91R ₃ -301 CK	1.378	—	2.137	—	1.864	—

注: In. 接种 inoculated

2.2 不同品种感染SMV后总黄酮的变化

与总多酚的结果类似, R₁期抗感病的未接种健株总黄酮量差异明显,抗病种质大于感病品种,接种SMV后感病品种总黄酮含量显著增加,增量高达

152.12%,抗病品种略有增加。而R₃、R₅期无论抗病还是感病品种接种后与对照差异渐小,趋势亦与总多酚相同, R₃期抗病品种接种接近对照,感病品种接种大于对照; R₅期抗、感病品种接种均小于对

表2 不同抗性大豆各生育阶段总黄酮的含量变化

Table 2 Change of total flavonoids content of soybean with different resistance to SMV at growing stages (mg/g, O. D400)

品种名 Variety	R ₁		R ₃		R ₅	
	总黄酮 Total flavonoids		总黄酮 Total flavonoids		总黄酮 Total flavonoids	
	mg/g	±%	mg/g	±%	mg/g	±%
合丰 25 In. Hefeng 25 In.	0.653	152.12	0.598	20.08	0.593	-14.06
合丰 25 CK Hefeng25 CK	0.259	—	0.498	—	0.690	—
黑农 16 In. Heinong16 In.	0.928	128.01	0.839	21.95	0.705	-14.10
黑农 16 CK Heinong16 CK	0.407	—	0.688	—	0.846	—
哈 91R ₃ -184 In. Ha91R ₃ -184 In.	1.082	11.89	1.399	-6.23	1.072	-8.22
哈 91R ₃ -184 CK Ha91R ₃ -184 CK	0.967	—	1.492	—	1.168	—
哈 91R ₃ -301 In. Ha91R ₃ -301 In.	1.057	19.03	1.144	8.54	0.874	-5.21
哈 91R ₃ -301 CK Ha91R ₃ -301 CK	0.888	—	1.054	—	0.922	—

照(表2)。

2.3 不同品种感染SMV后总黄酮及总多酚的动态变化

无论是总黄酮还是总多酚,抗病品种接种与对照在生育阶段中的变化趋势都是一致的;感病品种

健株的两个指标生育阶段呈逐渐增加趋势,接种后总黄酮含量随生育阶段推进而降低,而总多酚含量呈折线减增(图1)。说明SMV的侵染没有对抗病品种多酚类物质代谢造成影响,而对感染品种造成的影响很大。

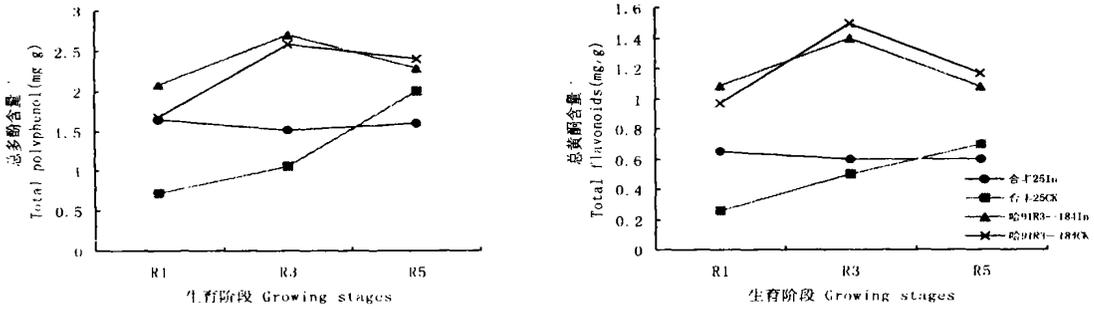


图1 不同品种生育阶段中总多酚、总黄酮的变化动态

Table 1 The dynamic changes of total polyphenol and total flavonoids of soybean with different resistance to SMV at growing stages

2.4 抗感病品种各生育阶段黄酮配基的变化

抗感病品种各生育阶段叶片黄酮配基变化见表3。

3. 抗感病品种未接种健株有相同的配基组成, 仅峰值略有差异。抗病品种除在R3期哈91R3-301接种后缺少P2配基而增加P4配基外, 其余各生育阶段接种与对照相比没有配基种类及峰值的大变化。

各时期感病品种接种后P1、P2、P4因感染SMV3峰值而增加, R1期接种后合丰25增加了P3配基, 黑农16增加P2配基; R3期合丰25也增加了P3配基, 而黑农16无变化; R5期合丰25增加了P3配基缺少了P4配基, 黑农16增加P3配基而缺少了P2、P4配基。

表3 不同抗性大豆各生育阶段类黄酮配基(以色谱峰计)的变化

Table 3 Change of flavanoids (Chromatograph peak) of soybean with different resistance to SMV at growing stages

时期 Stage	品种 Variety	P ₁		P ₂		P ₃		P ₄	
		A	%	A	%	A	%	A	%
R ₁	Hefeng 25 In.	16937	23.24	4924	7.00	4383	62.32	5231	7.44
	Hefeng 25 CK	7875	62.58	2500	19.87	—	—	2208	17.55
	Heinong 16 In.	6820	58.15	1600	13.64	—	—	3309	28.21
	Heinong 16 CK	5563	79.32	—	—	—	—	1450	20.68
	Ha91R ₃ -184 In.	7151	36.25	8054	40.83	—	—	4523	22.93
	Ha91R ₃ -184 CK	8610	57.20	3809	25.30	—	—	2634	17.50
	Ha91R ₃ -301 In.	7252	70.39	1720	16.70	—	—	1330	12.91
	Ha91R ₃ -301 CK	7535	71.83	1921	18.31	—	—	1034	8.86
R ₃	Hefeng 25 In.	8880	46.66	630	3.31	8449	44.40	1071	5.63
	Hefeng 25 CK	7059	78.58	1086	12.09	—	—	838	9.33
	Heinong 16 In.	6025	84.41	640	8.77	—	—	473	6.62
	Heinong 16 CK	6041	86.92	547	7.87	—	—	362	5.21
	Ha91R ₃ -184 In.	11985	71.58	3221	19.24	—	—	1537	9.18
	Ha91R ₃ -184 CK	9020	69.81	2763	21.38	—	—	1138	8.81
	Ha91R ₃ -301 In.	6982	92.23	—	—	—	—	588	7.77
	Ha91R ₃ -301 CK	3963	75.31	1299	24.69	—	—	—	—
R ₅	Hefeng 25 In.	12419	42.41	—	—	16861	57.59	—	—
	Hefeng 25 CK	7130	75.75	—	—	—	—	2282	24.25
	Heinong 16 In.	10858	37.97	—	—	17735	62.03	—	—
	Heinong 16 CK	8561	48.25	4866	27.42	—	—	43.17	24.33
	Ha91R ₃ -184 In.	8085	59.63	3620	26.70	—	—	1854	13.67
	Ha91R ₃ -184 CK	7522	59.73	3797	30.50	—	—	1275	10.12
	Ha91R ₃ -301 In.	6857	64.74	2132	20.13	—	—	1602	15.13
	Ha91R ₃ -301 CK	6645	65.02	1816	17.77	—	—	1759	17.21

注: “—”: 未检出或痕量。No detection or trace. A: 峰面积积分值。Peak integral value. %: 归一化%。Convergence%.

3 讨论

酚类化合物在植物抗病中的作用一是表现为对病原物毒害作用, 二是以植保素的形式对植物起保

护作用。在植物体内对PAL活性调节是通过黄酮类化合物末端的抑制而起作用。抗病品种哈91R₃-184、91R₃-301未接种健株的总多酚和总黄酮含量在R₁期显著高于感病品种, 感染SMV₃后酚类物质有先增加后减少的过程, 说明大豆的总多酚和总

黄酮含量都与抗病性有关。由于抗病品种抗性基因的表达作用,总多酚、总黄酮在 R₁ 增长导致了负反馈抑制作用,使后期出现负增长。感病品种合丰 25、黑农 16 接种 SMV₃ 后总多酚、总黄酮在 R₁ 期大幅度增加,在 R₃、R₅ 时期增减幅始终高于抗病品种,说明与抗病品种相比并没有反馈抑制作用发生;而在鼓粒期 R₅ 总多酚、总黄酮含量减少,可能是与黄酮类物质参与褐斑粒形成有关^[3]。

抗感病品种两项指标在生育阶段中的变化趋势不同,抗病品种接种与对照趋势基本一致,感病品种接种与对照差异很大,表明:SMV₃ 的侵染没有给抗病品种生育进程中某些生理活动造成明显影响。

由于抗病基因负反馈作用的表达,使其在接种 SMV₃ 后没有造成黄酮配基组成的改变。感病品种接种后 P₁、P₂、P₄ 峰值因感染 SMV₃ 而显著增加,而且在不同时期发生了配基组成种类的变化。因此,

大豆叶片中总多酚、总黄酮的含量及其在生育阶段的动态变化和接种后黄酮配基种类的变化都可作为鉴定抗感病品种的生化指标。

参 考 文 献

- 1 章元寿. 植物病理生理学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1996. 204—205.
- 2 张军, 杨庆凯, 王守文, 等. 大豆抗 SCN₃ 过程中总酚含量动态分析[J]. 大豆科学, 2002, 21(1): 71—74.
- 3 滕冰, 吴宗璞, 高凤兰, 等. 大豆感染 SMV 后种粒多酚物质变化的研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(1): 40—43.
- 4 Harborne JB 编著, 戴凯论译. 黄酮类化合物[M]. 北京:科学出版社, 1983.
- 5 滕冰, 吴宗璞. 大豆斑驳粒总类黄酮 Zr⁴⁺ 络合物 TLC 的扫描分析[J]. 大豆科学, 1999, 18(1): 42—45.
- 6 付玉清. 我国大豆花叶病毒病的研究进展[J]. 大豆科学, 1995, (1): 60—66.

ANALYSIS OF THE CHANGES OF POLYPHENOLIC SUBSTANCE IN SOYBEAN INFECTED BY SMV₃

Luan Xiaoyan Chen Yi Du Weiguang Man Weiqun Zhang Guiru Liu Xinlei

(Soybean Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086)

Abstract The contents of total polyphenol and total flavonoids(CPF) were determined in 4 cultivars (2 resistant, 2 susceptible) inoculated with SMV₃ at different stages. The results indicated that (1) CPF in resistant cultivars were higher than CPF in susceptible cultivars when they were not inoculated with SMV₃; (2) CPF in resistant cultivars inoculated with SMV₃ varied a little as compared with those not inoculated with SMV₃, CPF in susceptible cultivars inoculated with SMV₃ increased as compared with those not inoculated with SMV₃, and changes of CPF displayed different curves between resistant cultivars and susceptible cultivars; (3) the composition of flavonoids in resistant cultivars were same as that in susceptible cultivars. P₃ of flavonoids increased and P₄ of flavonoids decreased when susceptible cultivars were inoculated with SMV₃. Therefore, the changes of CPF and composition of flavonoids can be considered as a physiochemical target to determine resistance of cultivars.

Key words Soybean Mosaic Virus(SMV); Plant resistance; Total flavonoids; Total Polyphenol