

低温对大豆不同耐冷性中萌发期保护酶活性的影响

郝 晶,张立军,谢甫绶

(沈阳农业大学生物技术学院,沈阳 110161)

摘要 以大豆耐冷品种 Kottman 和铁丰 31 号、冷敏感品种沈农 8 号和东农 46 号为材料,以 20 ℃ 为对照研究在 10 ℃ 和 6 ℃ 低温下萌发过程中大豆抗氧化保护酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性变化。结果表明,随温度降低,抗冷性不同的大豆品种抗氧化酶活性变化表现出明显的差异。在 6 ℃ 下,在萌发的中后期,耐冷品种铁丰 31 号和 Kottman 的 SOD 活性仍相对稳定并维持较高活性,POD 活性迅速上升,并一直显著高于冷敏感品种。在 6 ℃ 下,耐冷品种的 CAT 活性在萌发初期(0~9 d)有大幅下降,然后随着萌发的进程而缓慢上升,而冷敏感品种 CAT 活性在萌发的(0~9 d)大幅下降,此后小幅下降后又缓慢回升。试验表明,耐冷大豆品种在萌发期间的 SOD、POD、CAT 活性对低温反应灵敏,低温处理后活性较高或较稳定;耐冷品种和冷敏感品种的 CAT 活性变化在低温(6 ℃)下的差异最大,这表明过氧化氢酶在大豆种子萌发过程的活性氧代谢中可能具有较关键的作用。

关键词 低温;种子萌发;保护酶

中图分类号 S565.101 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0171-05

EFFECTS OF THE LOW TEMPERATURE ON DEFENSE ENZYME ACTIVITIES OF DIFFERENT CHILLING-TOLERANT SOYBEAN CULTIVARS DURING THE GERMINATION

HAO Jing,ZHANG Li-jun,XIE Fu-ti

(Bio-technology College of Shenyang Agricultural University,Shenyang 110161)

Abstract The chilling-tolerant soybean cultivars Kottman and Tiefeng 31 and the chilling-sensitive soybean Shennong 8 and Dongnong 46 were used as experimental materials. Their seeds were germinated under low temperature, 10 ℃ and 6 ℃. The changes of superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT) activities were investigated, compared with those under 20℃, during seed germination stage. The results showed that the soybean cultivars with different cold tolerance presented remarkably change trends in the defense enzyme activities as the temperature decrease. Under 6 ℃, the tolerant cultivars Kottman and Tiefeng 31 presented a relatively stable and higher SOD activity during the middle and late stage of germination, and POD activity increased rapidly as the germination develops and was notably higher than the sensitive ones in all the process. Under the same low temperature, CAT activity in the tolerant cultivars and the sensitive cultivars decreased dramatically during the early stage of germination (0~9 d), then the tolerant cultivars CAT activity increased slightly as the germination develops, but the

sensitive cultivars, CAT activity decreased slowly during the stage of germination (9 ~ 15 d), then increased slowly. These results suggested that SOD, POD and CAT activities in the tolerant soybean cultivars response quickly to low temperature during seed germination period, which activities were higher or more stable compared with the sensitive cultivars. There was a significant difference in CAT activity between the tolerant and sensitive cultivars under 6 °C. This implied that CAT may play a pivotal role in reactive oxygen species metabolism during soybean germination.

Key words Soybean; Low temperature; Germination; Defense enzyme

大豆虽然是喜温作物,但是在萌发期和幼苗期对低温有较强的适应能力,在 10 °C ~ 12 °C 即可正常发芽,发芽的最低温度可达 6 °C ~ 8 °C。然而大豆在萌发期遇到低温仍然会降低萌发率,延迟萌发和出苗,影响幼苗的整齐度,对大豆产量的形成产生不利影响。大量的研究表明,植物受低温等逆境胁迫时,细胞内氧化代谢平衡失调,产生活性氧引发或加剧膜脂过氧化作用,造成细胞膜系统损伤^[1]。植物对活性氧胁迫的抗性与活性氧的清除能力密切相关。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等是植物体内主要的活性氧清除剂,三者协调一致可使活性氧维持在正常水平上,从而防止伤害,因此它们被称为保护酶系统。该酶系统的活性与植物抗寒能力的关系已有较多研究^[2-5]。大豆耐低温萌发是一个复杂过程,其萌发特性已得到较详细的研究^[6,7]。大豆种子萌发过程中的抗氧化酶活性变化也有报道^[8]。但关于不同耐低温大豆品种在低温下萌发过程中的活性氧清除能力变化的比较研究尚少见报道。本文测定大豆耐冷品种和冷敏感品种在低温下萌发过程中的保护酶活性变化,以进一步探索大豆萌发期耐低温的机制,为通过育种和栽培措施提高大豆低温抗性提供理论依据。

1 材料与方法

大豆东农 46 号由黑龙江省农科院提供,沈农 8 号、铁丰 31 号、Kottman 由沈阳农业大学大豆研究室提供。大豆种子经 0.1% 次氯酸钠浸泡 10 min 消毒后,用蒸馏水冲洗 3 遍,均匀摆放在培养皿双层滤纸上,每皿 50 粒,置于 10 °C 和 6 °C 低温下进行萌发,以 20 °C 为对照,在不同时间取样进行生理生化指标的测定,重复 3 次。

SOD 的活性测定采用 NBT 法^[9],以抑制氮蓝四唑(NBT)光还原的 50% 酶量为 1 个酶活力单位

(U);POD 活性测定采用愈创木酚法^[10],以 ΔA_{470} 1 min 内变化 0.01 为 1 酶活单位(U);CAT 活性测定采用紫外吸收法^[11],以 ΔA_{240} 1 min 内减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位(U)。每次测定重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下大豆种子萌发过程 SOD 活性的变化

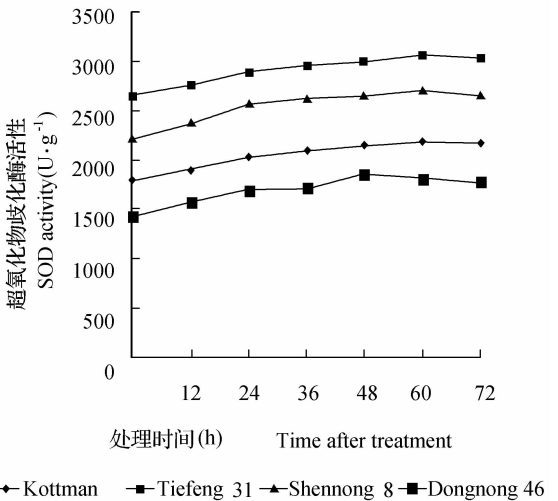


图 1 20 °C 下大豆种子萌发过程中 SOD 活性的变化
Fig.1 SOD activity of soybean germinating seed under 20 °C

由图 1 可见,在 20 °C 下,大豆种子萌发过程中, SOD 活性变化的总趋势是随着种子萌发活性上升,但是活性上升缓慢,后期保持平衡或略有下降,不同耐冷性品种的 SOD 活性的变化趋势相同,然而 SOD 活性大小在不同耐冷性品种之间没有规律,在整个测定期间 SOD 活性始终是铁丰 31 号(耐冷) > 沈农 8 号(冷敏感) > Kottman (耐冷) > 东农 46 号(冷敏感)。由图 2 可见,在 10 °C 下,各个品种的低温变化趋势与 20 °C 下基本相同,只是在萌发的后期 SOD 活性降低幅度较大。由图 3 可见,在 6 °C 下,萌发的开始阶段,各个品种的 SOD 活性大小顺序与 20 °C 和 10 °C 处理相同,在萌发的中后期,耐冷品种铁丰 31 号和 Kottman 的 SOD 活性仍相对稳定,而冷敏感

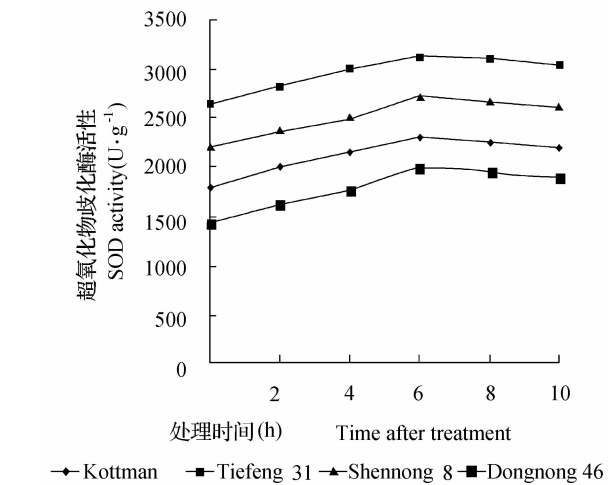


图 2 10 °C 下大豆种子萌发过程中 SOD 活性的变化
Fig.2 SOD activity of soybean germinating seed under 10 °C

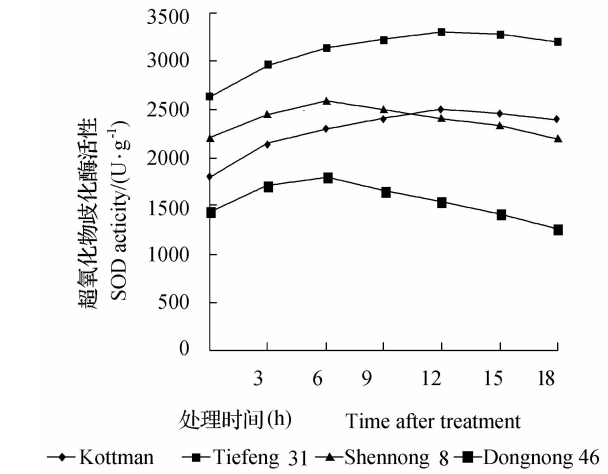


图 3 6 °C 下大豆种子萌发过程中 SOD 活性的变化
Fig.3 SOD activity of soybean germinating seed under 6 °C
品种沈农 8 号和东农 46 号从萌发的第 6 d 开始下降直到试验结束,其中东农 46 号下降幅度更大一些。

2.2 低温胁迫下大豆种子萌发过程中 POD 活性的变化

由图 4 可见,在 20 °C 下,在大豆种子萌发过程中,POD 活性变化的总趋势是随着种子萌发进程活性上升,上升的变化幅度大于 SOD,不同耐冷性品种的 POD 活性的变化趋势相同,但是 POD 活性大小在不同耐冷性品种之间没有规律。在萌发前期,POD 活性是东农 46 号(冷敏感) > Kottman(耐冷) > 铁丰 31 号(耐冷) > 沈农 8 号(冷敏感)。萌发 36 h 后至测定结束,POD 活性是 Kottman(耐冷) > 东农 46 号(冷敏感) > 铁丰 31 号(耐冷) > 沈农 8 号(冷敏感)。由图 5 可见,在 10 °C 下,POD 活性变化

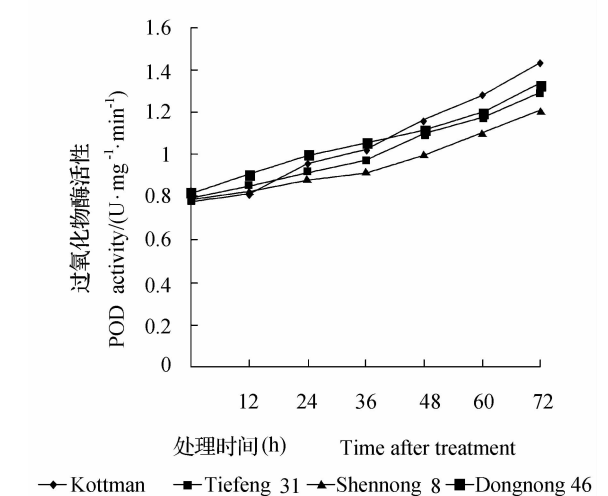


图 4 20 °C 下大豆种子萌发过程中 POD 活性的变化
Fig.4 POD activity of soybean germinating seed under 20 °C

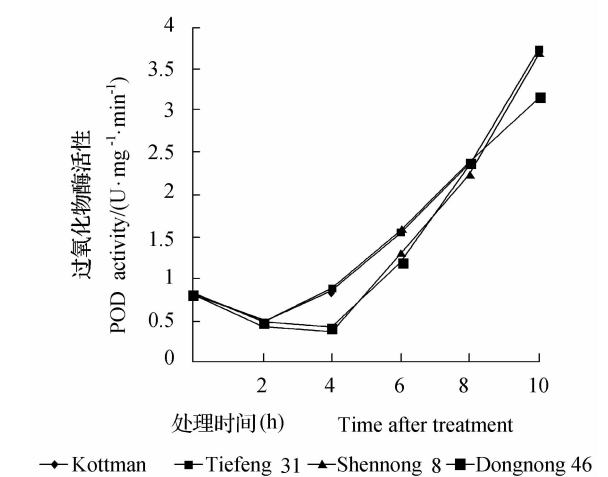


图 5 10 °C 下大豆种子萌发过程中 POD 活性的变化
Fig.5 POD activity of soybean germinating seed under 10 °C

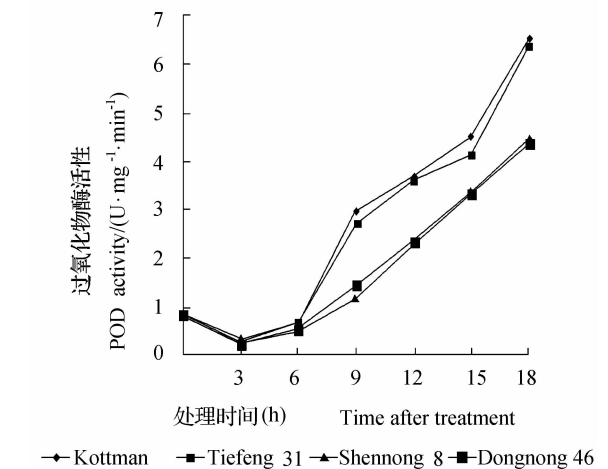


图 6 6 °C 下大豆种子萌发过程中 POD 活性的变化
Fig.6 POD activity of soybean germinating seed under 6 °C

的总趋势是在萌发的初期活性有小幅度的下降,然后随着萌发的进程迅速上升。然而,与耐冷品种 Kottman 和铁丰 31 号相比,冷敏感品种沈农 8 号和东农 46 号的 POD 活性下降的幅度大,延续的时间长,回升的时间晚。从萌发处理的第 2 d 至第 8 d,冷敏感的品种的 POD 活性都低耐冷品种。由图 6 可见,在 6 ℃ 下,萌发前 6 d,不同耐冷性品种的 POD 活性的大小和变化趋势相同,以后,耐冷品种 Kottman 和铁丰 31 号 POD 活性迅速上升,两品种的 POD 活性大小相近,冷敏感品种沈农 8 号和东农 46 号 POD 活性也上升迅速,但是活性一直显著低于耐冷品种,且两个品种的活性大小相近。

2.3 低温胁迫下大豆种子萌发过程中 CAT 活性的变化

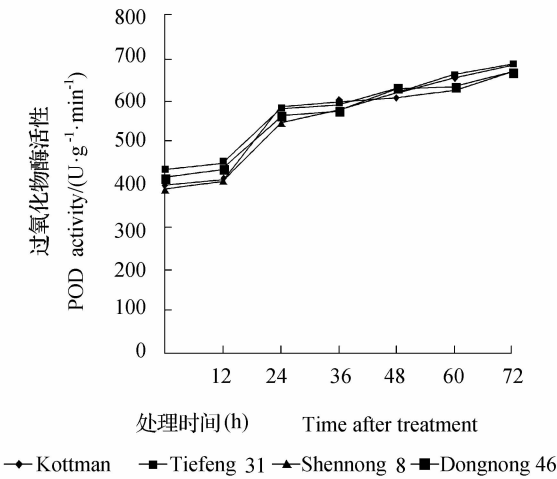


图 7 20 ℃ 下大豆种子萌发过程中 CAT 活性的变化
Fig.7 CAT activity of soybean germinating seed under 20 ℃

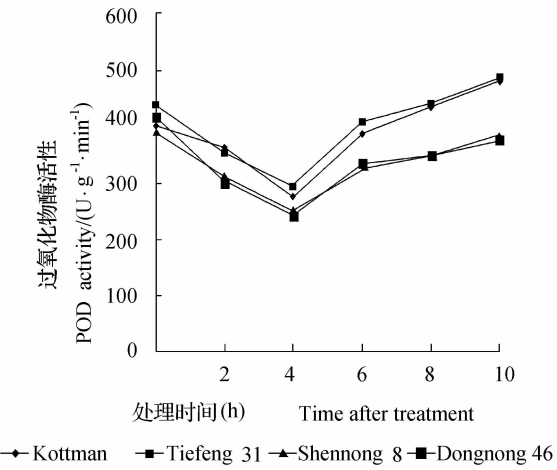


图 8 10 ℃ 下大豆种子萌发过程中 CAT 活性的变化
Fig.8 CAT activity of soybean germinating seed under 10 ℃

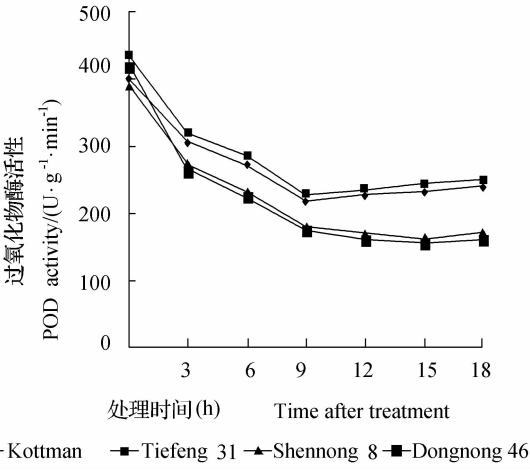


图 9 6 ℃ 下大豆种子萌发过程中 CAT 活性的变化
Fig.9 CAT activity of soybean germinating seed under 6 ℃

由图 7 可见,在 20 ℃ 下,在大豆种子萌发过程中,各品种 CAT 活性变化的总趋势是随着种子萌发活性上升,不同品种的 CAT 活性大小非常相近,在不同耐冷性品种之间没有规律。由图 8 可见,在 10 ℃ 下,各品种 CAT 活性在萌发初期(0 ~ 4 d)有大幅下降,然后随着种子萌发进程迅速上升。在整个萌发期,冷敏感品种东农 46 号和沈农 8 号的 CAT 活性始终低于耐冷品种 Kottman 和铁丰 31 号,且在萌发的后期(4 ~ 10 d)差异的幅度更大。由图 9 可见,在 6 ℃ 下,耐冷品种和冷敏感品种表现出不同的变化趋势,耐冷品种在萌发初期(0 ~ 9 d)CAT 活性有大幅下降,然后随着萌发的进程而缓慢上升,试验结束时,Kottman 比处理第 9 d 的 CAT 活性增加了 8.7%,铁丰 31 号增加了 8.7%。而冷敏感品种 CAT 活性在萌发的前期(0 ~ 9 d)大幅下降,此后(9 ~ 15 d)有小幅下降后又缓慢回升。实验结束时,沈农 8 号比处理第 9 d 的 CAT 活性降低了 4.2%,东农 46 号降低了 7.5%。

3 讨论

在逆境下,植物细胞内活性氧自由基大量增加。这些活性氧极易攻击膜脂,使细胞膜受损。植物在长期进化中形成了一套内源抗氧化保护酶系统^[12~14]。试验表明,耐冷性不同品种的保护酶活性对低温胁迫表现出明显不同的反应特征,尽管在可忍受的低温范围内,耐冷品种和冷敏感品种都会及时做出酶活性调整,以适应温度的变化。研究表明,在较低的温度(本试验为 6 ℃)下,与冷敏感品

种相比,耐冷品种在萌发期间的 SOD、POD、CAT 活性对低温反应灵敏,活性上升较快而且活性较高或较稳定。这说明冷敏感品种对低温反应迟缓,不能及时做出酶活性调整,而且酶活性的稳定性差,例如,在本试验中,冷敏感的东农 46 号和沈农 8 号的 SOD 活性都表现出明显下降的趋势。在本研究中,耐冷品种和冷敏感品种的 CAT 活性变化在低温(6℃)下的差异最大,这表明 CAT 或 H₂O₂在大豆种子萌发过程中的活性氧代谢中具有较关键的作用。有报道过 H₂O₂处理促进种子的萌发^[15],但是在大豆低温萌发中 H₂O₂有何作用还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 王宝山. 生物自由基与植物膜伤害[J]. 植物生理通讯,1988, 33:73 - 96.

[2] 杨柏云,熊冬金,黄亚萍,等. 适度低温对棉花细胞保护酶系统的影响[J]. 南昌大学学报,1996,12(4):320 - 323.

[3] 陈善娜,梁斌,张蜀君等. 云南高原水稻幼苗的抗冷性与其活性氧清除系统的关系[J]. 中国水稻科学,1995, 17(14):452 - 458.

[4] 吴建慧,杨玲,孙国荣. 低温胁迫下玉米幼苗叶片活性氧的产生及保护酶活性的变化[J]. 植物研究,2004,24,(4)456 - 459.

[5] G. Sknudlik, R. Baczek Kwinta, J. Koscieliak. The effect of short warm breaks during chilling on photosynthesis and the activity of antioxidant enzymes in plants sensitive to chilling[J]. Journal of

Agronomy,2000,184:233.

[6] 张思河,王萍,马淑英,等. 三个熟期类型大豆种子萌发进程中耐冷性的比较[J]. 大豆科学,2000, 19(3):218 - 222.

[7] 马淑英,尹田夫. 低温对不同耐冷大豆萌发种子游离脯氨酸变化的影响[J]. 吉林农业科学 1998,4:88 - 90.

[8] 傅爱根,王爱国,罗广华. 大豆萌发过程中的活性氧代谢[J]. 热带与亚热带学报,1997,5(4):32 - 38

[9] 王爱国,罗广华,邵从本,等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报,1983,9(1):77 - 84.

[10] Kochba J, Lavee S, Spiegel Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non embryogenic ‘Shamouti’organe ovular callus lines[J]. Plant Cell Physiology, 1977,18:463 - 467.

[11] Trevor E, Kraus R, Austin Fletcher. Paclobutrazol preprotects wheat seedlings from heat and paraquat injury is detoxification of active oxygen involed[J]. Plant Cell Physiology, 1994, 35(1):45 - 52.

[12] Christine H. Foyer, Maud Lelandais, Karl J. Kunert Photooxidation stress in plants[J]. Physiology Plant,1994,92:696 - 717.

[13] D. Mark Hodges, Christopher J. Andrews, Douglas A. Johnson. et al. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines[J]. J. Exp. Bot, 1997, 48(310):1105 - 1113.

[14] Prasad T K. Mechanism of chilling induced oxidative stress injury and tolerance, changes in antioxidant system, oxidation of proteion and lipids and protease activities[J]. Plant Journal, 1996, 10: 1017 - 1026.

[15] 张东向. H₂O₂对水稻和玉米种子萌发的影响[J]. 植物生理学通讯,1996,32(2):115 - 117.

(上接 170 页)

间,但是大豆产量是通过群体产量实现的,单株营养面积过大则易造成群体密度过小影响群体产量,单株营养面积过小则易造成群体内单株生长空间狭小,叶片过早脱落甚至倒伏影响群体产量。

本研究从正方形试验设计探讨不同品种类型品种单株营养面积和产量及产量相关性状的关系。为进一步优化群体结构和单株田间分布的关系,应结合生产上广泛应用的 65 ~ 70 cm 垄作栽培条件下的平均单株营养面积和产量及产量相关因素进行对比研究,从而寻求最佳的田间群体结构和单株配置关系。

参 考 文 献

[1] 胡立成. 大豆“两垄一平台”栽培法研究[J]. 大豆科学, 1985,4(1):51 - 60.

[2] 刘忠堂. 大豆窄行密植高产栽培技术的研究[J]. 大豆科学, 2002,21(2):117 - 121.

[3] 韩秉进,陈渊,金剑. 大豆有效营养面积研究[J]. 中国油料作物学报,2002,24(4):33 - 37.

[4] 韩秉进,金剑,中嶋博. “黑农 35”大豆有效营养面积的研究[J]. 中国生态农业学报,2005,13(4):78 - 81.