

## O<sub>3</sub> 浓度升高和 UV-B 辐射增强对大豆叶片抗氧化酶活性及 POD 同工酶的影响

刘轶鸥,王 岩,刘 波,杨 兴,赵天宏

(沈阳农业大学 农学院,辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**以大豆品种铁丰 29 为材料,利用开顶式气室(OTCs)研究了 O<sub>3</sub> 浓度升高和 UV-B 辐射增强单独胁迫及复合胁迫下大豆叶片抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)活性及 POD 同工酶谱带的变化。结果表明:O<sub>3</sub> 处理大豆叶片 SOD、CAT 和 POD 活性均低于对照;UV 处理下,大豆叶片 SOD、CAT、POD 活性也均低于对照,但基本高于 O<sub>3</sub> 处理;O<sub>3</sub> 及 UV 复合处理下,加剧了 SOD、CAT、POD 活性的减弱。对 POD 同工酶研究发现,在分枝期,O<sub>3</sub> 处理产生 1 条新谱带,开花期和结荚期均比分枝期多 2 条谱带,并且受胁迫处理的 POD 酶谱带与对照相比颜色较浅,说明在整个生育期,胁迫处理下的大豆叶片 POD 同工酶活性受到抑制。

**关键词:**O<sub>3</sub> 浓度升高;UV-B 辐射增强;复合作用;大豆叶片;抗氧化酶;POD 同工酶

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2013)02-0202-04

## Combined Effects of Elevated O<sub>3</sub> Concentration and UV-B Radiation on Anti-Oxidative Enzymes Activities and POD Enzymes Isozymes of Soybean

LIU Yi-ou, WANG Yan, LIU Bo, YANG Xing, ZHAO Tian-hong

(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** During the last several decades, significant reductions in the concentrations of stratospheric ozone (O<sub>3</sub>) have been reported. The decrease of ozone concentration causes an increment of ultraviolet-B radiation to earth surface. The objective of this experiment is to reveal the toxicological mechanism under elevated ozone concentration and UV-B radiation singly or in combination on plant anti-oxidation enzymes activities and POD isoenzyme. Open-top chambers (OTCs) were utilized to investigate change of anti-oxidation enzymes activities and POD isoenzyme band in soybean (*Glycine max*) leaves under elevated ozone concentration and UV-B radiation singly or in combination treatment. The results of anti-oxidation enzymes activities indicated that either O<sub>3</sub> treatment or UV-B treatment induced a decrease on SOD, POD and CAT, and in the combined stress, anti-oxidation enzymes activities had intensified this trend to a certain degree. The result of POD isozyme band showed that a new band appeared under O<sub>3</sub> treatment in branching stage and two new bands appeared in flowering stage and podding stage compared of branching stage, and the shade of color of POD isoenzyme bands was lighter compared to CK treatment. It was suggested that in all growth period, POD isoenzyme activity was inhibited under combined stress.

**Key words:** Elevated O<sub>3</sub> concentration; Elevated UV-B radiation; Combination; Soybean; Anti-oxidative enzymes; POD isoenzyme

近年来,由于大气中氮氧化物(NO<sub>x</sub>)和含氧有机挥发物(VOC<sub>s</sub>)的含量剧增,导致近地层大气 O<sub>3</sub> 浓度日益升高<sup>[1-2]</sup>。同时,由于臭氧层的侵蚀和破坏日趋加重,使到达地面的紫外辐射增强。据报道大气中臭氧每减少 1%,地球表面的 UV-B 强度就会增加 2%<sup>[3]</sup>。UV-B 辐射增强和 O<sub>3</sub> 浓度升高对植物形态特征、生物量、光合作用等生理生化机制产生了严重影响,可造成植物叶片可见伤害,引起植物生物量减少,增加膜脂透性,引起膜脂过氧化,以及减弱植物的抗氧化能力<sup>[4]</sup>。

随着 O<sub>3</sub> 浓度的增加,过氧化氢酶(CAT)、过氧

化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)等抗氧化酶由于底物浓度增加而加速合成,这些酶活性增加是植物对 O<sub>3</sub> 胁迫的响应。以冬小麦、水稻、大豆为材料的研究表明,SOD、CAT 活性开始均随 O<sub>3</sub> 体积分数增加而迅速增强,但到达峰值后又急剧或逐渐下降<sup>[5]</sup>。而杨铁钊<sup>[6]</sup>的研究表明,低温下烟草叶片遭遇 O<sub>3</sub> 伤害后,POD 活性急剧下降。UV-B 辐射可以导致活性氧(ROS)代谢失衡。晏斌等<sup>[7]</sup>在模拟 UV-B 辐射伤害水稻的实验中发现,在 UV-B 辐射增强的条件下,水稻叶片中的 SOD、CAT、POD 等酶的活性随着 UV-B 辐射时间

收稿日期:2012-12-21

基金项目:国家自然科学基金(30970448);辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LJQ2011072)。

第一作者简介:刘轶鸥(1987-),女,在读硕士,主要从事植物生理生态研究。E-mail:asshuangzi@163.com。

通讯作者:赵天宏(1972-),男,教授,博士生导师,主要从事农业生态学研究。E-mail:zth1999@163.com。

的延长而降低。从同工酶的分析中可以初步了解各种植物对不良环境的适应情况及基因的变异情况<sup>[8-9]</sup>。过氧化物酶(POD)是植物次生代谢系统中重要防御酶系统之一,在复合胁迫中起重要作用。徐心诚<sup>[10]</sup>对黄瓜进行低温弱光处理,发现 POD 同工酶谱的条带数明显增加,在逆境条件下植物体为适应恶劣环境而产生大量 POD 同工酶,以清除细胞内过量的自由基。

目前,关于 O<sub>3</sub>胁迫和 UV-B 辐射胁迫对大豆叶片 POD 影响的研究多侧重于其活性,而对 POD 同工酶谱带的影响报道还较少。因此,现以大豆叶片为试材,研究 O<sub>3</sub>胁迫、UV-B 胁迫及二者复合胁迫对大豆叶片抗氧化酶活性及 POD 同工酶谱的影响,以期为进一步研究逆境对植物的伤害提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

试验于 2011 年在中国科学院沈阳野外农田生态系统生态站进行。

以大豆品种铁丰 29 为试验材料。利用开顶室气室(OTC<sub>s</sub>)对大豆进行熏蒸试验。主要设备为 12 个完全相同的 OTCs(横截面为正八边形,边长 1.15 m,高 2.4 m 玻璃室壁)及与其配套的通气、通风控制设备。O<sub>3</sub>浓度由臭氧发生器(GP-5J,中国)和臭氧传感器(S-900,新西兰),以及数据分析与自动控制充气系统控制。UV-B 辐射处理采用高度可调的钢架,悬挂 40 W 的 UV-B 灯管(北京电光源研究所生产,峰值 313 nm)于大豆植株上方 40 cm 处,产生的 UV-B 辐射经 0.08 mm 乙酸纤维素膜过滤后照射大豆植株,模拟增强的 UV-B 辐射为 0.32 W·m<sup>-2</sup>,相当于沈阳地区夏日平均 UV-B 辐射增强 5% 左右。

试验共设 4 个处理即:CK 处理(OTC 中的对照,O<sub>3</sub>和 UV-B 为环境强度)、O<sub>3</sub>处理(O<sub>3</sub>浓度升高为 110 ± 10 nmol·mol<sup>-1</sup>)、UV 处理(UV-B 强度为 0.32 W·m<sup>-2</sup>)、O<sub>3</sub> × UV 处理(O<sub>3</sub>浓度 110 ± 10 nmol·mol<sup>-1</sup>、UV-B 强度 0.32 W·m<sup>-2</sup>)。每个处理 3 次重复。大豆于 2011 年 5 月 14 日在 OTC 内直接播种,出苗 20 d 后每天 8:00 ~ 17:00 开始胁迫试验,分别于大豆分枝期、开花期和结荚期取样,大豆成熟时停止胁迫处理。选取大豆相同叶片部位为试材,测定相关形态及生理生化指标。

### 1.2 测定项目与方法

#### 1.2.1 抗氧化酶活性 超氧化物歧化酶(SOD)活

性的测定采用 NBT 光氧化还原法,以抑制 NBT 光氧化还原 50% 的酶量为 1 个酶活性单位<sup>[11]</sup>;过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用紫外吸收法,以每分钟 OD<sub>240</sub>减少 0.01 为 1 个酶活力单位<sup>[14]</sup>;过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法,将每分钟 OD<sub>470</sub>增加 0.01 定义为 1 个酶活力单位<sup>[14]</sup>。

1.2.2 POD 同工酶电泳 称取 1 g 大豆鲜叶,在冰浴条件下加酶提取液(稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液)2 mL,研磨至匀浆。然后在低温冷冻离心机中 4℃、13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min,上清液即为酶提取液。采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行同工酶分析,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 3%,点样量为 35 μL·孔<sup>-1</sup>。电泳至溴酚蓝标志到达凝胶前沿为止。染色采用联苯胺溶液染色法<sup>[12]</sup>。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 12.0 和 Microsoft Excel 2003 对数据进行分析。

## 2 结果与分析

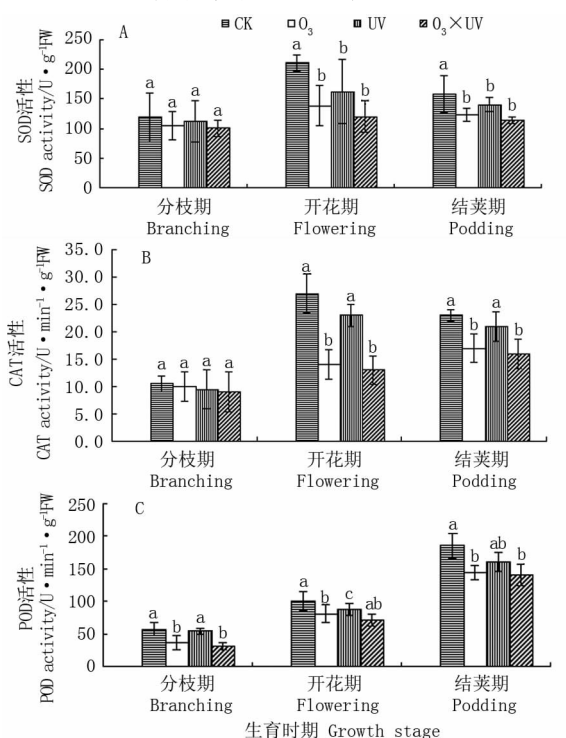
### 2.1 不同处理对大豆叶片抗氧化酶活性的影响

如图 1a 所示,随着大豆生育时期的延长,不同处理下大豆叶片 SOD 活性呈先上升后下降趋势。各生育时期,SOD 活性均表现为 CK 处理 > UV 处理 > O<sub>3</sub>处理 > O<sub>3</sub> × UV 处理。与对照相比,大豆叶片 SOD 活性的降幅,O<sub>3</sub>处理为 11.80% ~ 24.81%,UV 处理为 5.44% ~ 23.00%,O<sub>3</sub> × UV 处理为 11.09% ~ 40.70%。其中 O<sub>3</sub>胁迫处理在开花期和结荚期与对照差异均达到了显著水平( $P < 0.05$ )。

如图 1b 所示,随着大豆生育时期的延长,不同处理下大豆叶片 CAT 活性呈先上升后下降趋势。各生育时期,CAT 活性基本表现为 CK 处理 > UV 处理 > O<sub>3</sub>处理 > O<sub>3</sub> × UV 处理,在分枝期 O<sub>3</sub>处理高于 UV 处理。与对照相比,大豆叶片 CAT 活性的降幅,O<sub>3</sub>处理为 14.29% ~ 51.85%,UV 处理为 8.70% ~ 14.81%,O<sub>3</sub> × UV 处理为 4.76% ~ 48.15%;O<sub>3</sub>及复合处理在开花期和结荚期与对照差异均达到显著水平( $P < 0.05$ )。

如图 1c 所示,随着大豆生育时期的延长,不同处理下大豆叶片 POD 活性呈上升趋势。各生育时期,POD 活性的基本表现为 CK 处理 > UV 处理 > O<sub>3</sub>处理 > O<sub>3</sub> × UV 处理。与对照相比,大豆叶片 POD 活性的降幅,O<sub>3</sub>处理为 22.49% ~ 45.74%,UV 处理为 5.37% ~ 13.70%,O<sub>3</sub> × UV 处理为 19.23% ~ 35.47%;O<sub>3</sub>处理在分枝期、开花期和结荚期,UV 处

理在开花期,  $O_3 \times UV$  处理在分枝期和结荚期与对照差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。



图中同一时期不同小写字母表示不同处理间的差异达到 0.05 显著性水平。

Different lowercase letters in the same time show the significance of different treatments at 0.05 level.

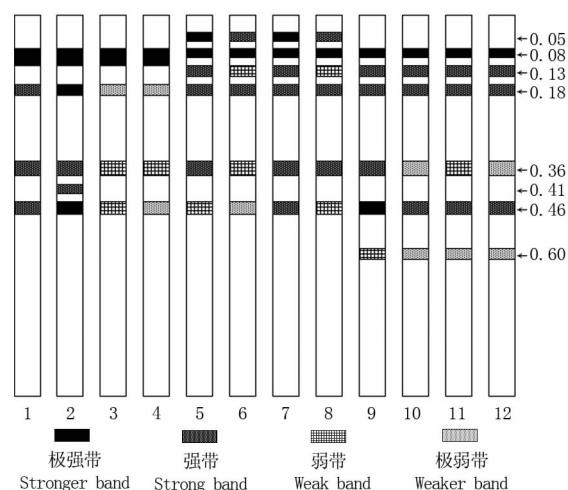
图1 不同处理下大豆叶片 SOD、CAT、POD 活性的变化

Fig. 1 Variation of SOD, CAT and POD activity in soybean leaves under different treatments

## 2.2 不同处理对大豆叶片 POD 同工酶的影响

如图 2 所示,在分枝期,UV 处理酶谱带的活性最强,表现为极强带和强带,与对照相比,  $O_3$  处理出现 1 条新的迁移率 (Rf) 为 0.41 的强带。UV 处理和  $O_3 \times UV$  处理,除谱带 Rf = 0.08 外,其余 3 条谱带均比较弱,且 Rf = 0.46 的谱带,  $O_3$  处理表现为弱带,  $O_3 \times UV$  处理表现为极弱;在开花期,谱带 Rf = 0.05 为新增谱带,分枝期和结荚期均没有出现,且 CK 和 UV 处理表现为极强带,  $O_3$  和  $O_3 \times UV$  处理表现为强带,谱带 Rf = 0.08 和 Rf = 0.18 在各处理表现一致,为极强带和强带,  $O_3$  处理在 Rf = 0.36 时,表现为弱带, Rf = 0.46 时,表现为极弱带;在结荚期,谱带 Rf = 0.08、Rf = 0.13、Rf = 0.18 各处理均表现一致,而在 Rf = 0.36 时,  $O_3$  和  $O_3 \times UV$  处理表现为极弱带,同时在结荚期出现 1 条新谱带 Rf = 0.60,但谱带颜色较暗,酶活性较弱。

在整个生育时期内,与对照相比,胁迫处理降低了 POD 同工酶的活性,使同工酶的表达受到了抑制,这与 POD 活性的测定结果一致。



1~4 分别为分枝期的处理 CK、 $O_3$ 、UV、 $O_3 \times UV$ ;

5~8 分别为开花期的处理 CK、 $O_3$ 、UV、 $O_3 \times UV$ ;

9~12 分别为结荚期的处理 CK、 $O_3$ 、UV、 $O_3 \times UV$ 。

1-4 are the treatment of CK,  $O_3$ , UV,  $O_3 \times UV$  at branching stage, respectively;

5-8 are the treatment of CK,  $O_3$ , UV,  $O_3 \times UV$  at flowering stage, respectively;

9-12 are treatment of CK,  $O_3$ , UV,  $O_3 \times UV$  at podding stage, respectively.

图2 不同处理下大豆叶片 POD 同工酶谱示意图

Fig. 2 Sketch map of POD isozymogram of soybean leaves under different treatments

## 3 结论与讨论

### 3.1 不同处理对大豆叶片抗氧化酶活性的影响

SOD、CAT 和 POD 是植物抗氧化酶系统中最为重要的 3 种保护酶<sup>[13]</sup>。三者相互协调,有效地清除代谢过程中产生的活性氧,使生物体内活性氧维持在一个较低的水平,防止活性氧引起的膜脂过氧化及其伤害过程<sup>[14]</sup>。在本试验中,随着高浓度臭氧的不断通入、高强度紫外灯光的照射,各生育时期大豆叶片的抗氧化酶活性均低于对照。王春乙等<sup>[15]</sup>的研究表明,在较强  $O_3$  胁迫下,植物细胞中活性氧自由基累积超过一定限度,其毒性破坏了细胞内多种功能膜和酶系统结构是致使植物叶片抗氧化酶活性下降的原因。

### 3.2 不同处理对大豆叶片 POD 同工酶活性的影响

不良环境的影响常引起基因的变异而导致酶结构及其活性的改变,这种改变反映在同工酶的酶谱上便出现了数量及迁移率不同的谱带<sup>[16]</sup>。谷俊涛等<sup>[17]</sup>发现水分胁迫下通过钙处理后小麦幼苗 POD 同工酶各酶带尤其主带活性一直保持较高水平。王孝宣等<sup>[18]</sup>研究发现,低温锻炼的耐寒番茄品种,其 POD、酯酶同工酶的谱带增加了 1~2 条,而

不耐寒品种则无类似的变化。在本试验中,开花期和结荚期与分枝期相比均多了 2 条谱带,说明随着大豆生育时期的延长,其叶片 POD 活性增强。酶活性增强主要与活性氧的积累有关,活性氧的积累能诱导抗氧化系统的生物合成。而某些酶有多个同工酶基因位点,在一般情况下部分位点不表达,而在环境发生变化或遭遇逆境时,这些位点的基因被激活表达产生新酶。在分枝期,O<sub>3</sub> 处理出现了一条新的谱带 Rf = 0.41,这说明在生育初期,臭氧胁迫表现的作用最为明显,而在开花期和结荚期这条谱带又消失了,说明随着生育时期的延长,大豆叶片体内抗氧化系统产生了保护作用。在整个生育时期,与对照相比,胁迫处理后的大豆叶片 POD 同工酶活性受到抑制,这可能与 POD 同工酶在受到 O<sub>3</sub> 浓度升高和 UV-B 辐射增强胁迫伤害时,肽链发生交联、断裂以及氨基酸降解等,改变了酶结构和功能有关。

单一 O<sub>3</sub> 胁迫和 UV-B 胁迫都使植物叶片抗氧化酶活性减弱,使植物受到严重伤害。在本试验中,胁迫处理的抗氧化酶活性较对照降低,并且复合胁迫都比单一处理(O<sub>3</sub> 处理或 UV 处理)受迫害程度加深,各处理抗氧化酶活性均表现为 CK 处理 > UV 处理 > O<sub>3</sub> 处理 > O<sub>3</sub> × UV 处理;POD 同工酶谱带出现了新增谱带及酶带宽度、颜色深浅上均发生变化,从而使原有的酶系活性改变。综上所述,O<sub>3</sub> 胁迫和 UV-B 复合胁迫使植物体内抗氧化酶活性减弱,对植物表现为伤害效应。

## 参考文献

- [1] Vingarzan R. A review of surface O<sub>3</sub> background levels and trends[J]. *Atmospheric Environment*, 2004, 38: 3431-3442.
- [2] Wang X, Mauzerall L. Characterizing distributions of surface ozone and its impact on grain production in China, Japan, and South Korea; 1990 and 2020 [J]. *Atmospheric Environment*, 2004, 38: 4383-4402.
- [3] Madronieh S, McKenzie R L, Caldwell M M. Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface [J]. *AMBIO*, 1995, 24: 143-152.
- [4] Tevini M, Teramura A H. UV-B effects on terrestrial plants[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2010, 50: 479-488.
- [5] Wustman B A, Oksanen E, Karnosky D F, et al. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on aspen clones varying in O<sub>3</sub> sensitivity: can CO<sub>2</sub> ameliorate the harmful effects of O<sub>3</sub> [J]. *Environmental Pollution*, 2001, 115: 473-481.
- [6] 杨铁钊,殷全玉,丁永乐,等. 烟草气孔特性、抗氧化酶活性与臭氧伤害的关系[J]. *植物生态学报*, 2004, 28(5): 672-679. (Yang T Z, Yin Q Y, Ding Y L, et al. Relationships between ozone injure and stoma parametres and activities of antioxidant enzyme [J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 2004, 28(5): 672-679. )
- [7] 晏斌,戴秋杰. 紫外线 B 对水稻叶组织中活性氧代谢及膜系统的影响[J]. *植物生理学报*, 1996 22(4): 373-378. (Yan B, Dai Q J. Effects of reactive oxygen species metabolism and membrane system on rice leaf under UV-B [J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1996 22(4): 373-378. )
- [8] Yamanchi M, Peng X. Iron toxicity and stress induced ethylene production in rice leaves [J]. *Plant and Soil*, 1995, 173: 21-28.
- [9] Krath B N, Hove-Jensen B. Organellar and cytosolic localization of four phosphoribosyl diphosphoryl diphosphate synthase isozymes in Spinach [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119: 497-505.
- [10] 徐心诚. 低温弱光对黄瓜幼苗 POD 同工酶的影响[J]. *商丘师范学院学报*, 2012, 28(3): 81-84. (Xu X C. Effects of chilling and weak light on peroxidase isoenzyme of cucumber [J]. *Journal of Shangqiu Teachers College*, 2012, 28(3): 81-84. )
- [11] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 163-168. (Zou Q. *Experimental manual on plant physiology* [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000: 163-168. )
- [12] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 2 版广州: 华南理工大学出版社, 2006: 72-73. (Chen J X, Wang X F. *Experimental manual on plant physiology* [M]. 2nd ed. Guangzhou: South China University Press, 2006: 72-73. )
- [13] Neill S J, Desikan R, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 53(372): 1237-1247.
- [14] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 601-639.
- [15] 王春乙, 自月明, 温民, 等. CO<sub>2</sub> 和 O<sub>3</sub> 浓度倍增及复合效应对大豆生长和产量的影响[J]. *环境科学*, 2004, 25(6): 7-10. (Wang C Y, Bai Y M, Wen M, et al. Effects of double CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on growth and yields in soybean [J]. *Environmental Science*, 2004, 25(6): 7-10. )
- [16] Toyomasu T, Zennyozzi A. On the application of isoenzyme electrophoresis to identification of strains in *Leurinus edodes* [J]. *Mushroom Science*, 1981, 11: 675-684.
- [17] 谷俊涛, 郭秀林, 李广敏, 等. 水分胁迫下钙、钙调素对小麦幼苗生长及过氧化物酶同工酶的影响[J]. *华北农学报*, 2001, 16(3): 62-67. (Gu J T, Guo X L, Li G M. The effects of Ca<sup>2+</sup> and CaM on growth and peroxidase isoenzymes of winter wheat seedling under water stress [J]. *Acta Agriculture Boreal-Sinica*, 2001, 16(3): 62-67. )
- [18] 王孝宣, 李树德, 东惠茹, 等. 低温对番茄苗期和开花期几种同工酶的影响[J]. *中国蔬菜*, 1997(3): 1-3. (Wang X X, Li S D, Dong H R, et al. Effect of chilling temperature on POD, esterase and SOD in tomato during seedling and florescence [J]. *China Vegetables*, 1997(3): 1-3. )