

大豆抗 SMV 生化机制的初步研究^{*}

沈文飏¹ 徐朗莱¹ 冯 晴² 高 玲¹

胡蕴珠³ 孙军礼³ 智海剑³

(1南京农业大学理学院生化室 南京 210095 2上海师范大学生物系,
上海 200234 3南京农业大学大豆研究所 南京 210095)

摘 要

以对 SMV-a 株系抗性不同的 3 个大豆品种为材料,分析了感染 SMV 后苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性的动态变化。结果表明,抗病品种科丰 1 号接种 SMV 的早期, PAL 和 POD 活性显著升高, SOD 和 CAT 活性明显下降;相反感病品种 1138-2 和徐豆 1 号的 SOD 和 CAT 活性明显上升, POD 活性的增加幅度则小于抗病品种,而 1138-2 的 PAL 活性则低于相应对照。

关键词 大豆;大豆花叶病毒;生化抗性机制

大豆花叶病毒 (SMV) 在我国大豆产区普遍发生,严重影响大豆的品质。目前有关其抗性机理的研究相对较少,且主要以侵染后期的大豆叶片来研究其抗性机制^[1]。本文选用对 SMV 抗性不同的 3 个大豆品种为材料,分析了接种 SMV-a 株系后大豆叶片苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性的动态变化,初步研究了大豆抗 SMV 性与生化指标的关系,并探讨了抗病性的生化机制,为今后深入开展大豆抗 SMV 的机理研究和筛选抗病品种提供参考资料。

材料与方 法

本试验供试材料为大豆品种科丰 1 号 (抗 SMV-a 株系,无症状)、徐豆 1 号 (感 SMV-a 株系,表现系统枯斑、叶脉坏死症状) 和 1138-2 (感 SMV-a 株系,表现系统花叶症状),均由南京农业大学大豆研究所提供。3 个品种均种于防虫网室,于真叶期接种 SMV-a 株系,以不含 SMV-a 株系的磷酸缓冲液处理为对照。

接种后于不同时间内取叶龄相同的大豆叶片进行各项生化指标测定,参照 Koukol

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39470455)

收稿日期 1998-02-17

Received on Feb. 17, 1998

等^[7]的方法测定苯丙氨酸解氨酶 (PAL)活性,徐朗莱等^[2]的方法测定过氧化物酶 (POD)活性,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性测定均参照前文^[3],可溶性蛋白含量按 Bradford^[6]的方法,以牛血清蛋白作为标准 上述生化指标测定均为 3次重复,取平均值。

结果与分析

1 接种 SMV- a株系后大豆叶片苯丙氨酸解氨酶活性的变化

抗感病大豆品种接种 SMV - a株系后苯丙氨酸解氨酶活性的变化相差很大。其中抗病品种科丰 1号的苯丙氨酸解氨酶活性与对照相比接种 8小时时就急剧上升,48小时酶活性达到最高峰,然后迅速进入活性下降的消退期,苯丙氨酸解氨酶活性均明显低于对照;相反,感病品种 1138- 2苯丙氨酸解氨酶活性的变化相对较平缓,且都低于相应的对照(见图 1)。由上可知,抗 SMV 的大豆品种在接种 SMV 后苯丙烷类代谢得到了很快的加强,而感病品种则有所减弱。

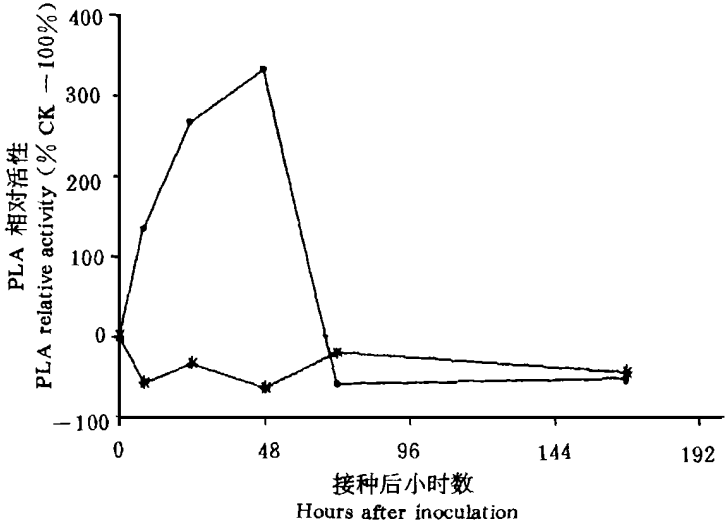


图 1 接种 SMV- a株系后抗病品种科丰 1号 (°)和感病品种 1138- 2(*) 苯丙氨酸解氨酶活性的动态变化

Fig. 1 Dynamic changes in PAL activities from resistant soybean cultivar of Kefeng- 1(°) and susceptible soybean cultivar of 1138- 2(*) during infection by SMV- a

2 接种 SMV- a株系后大豆叶片过氧化物酶活性的变化

由表 1可知,对 SMV 具有不同抗性水平的大豆品种过氧化物酶活性存在明显差异,感病品种 1138- 2和徐豆 1号明显高于抗病品种科丰 1号。接种 SMV- a株系后,上述各品种过氧化物酶活性均有不同程度的升高,其中抗病品种科丰 1号过氧化物酶活性增加很快,8小时就增加 42. 8%,接种 72小时时就比对照提高了 215. 1%;而感病品种上升较平缓,接种 72小时 1138- 2和徐豆 1号才分别提高了 36. 3%和 80. 0%。上述表明,SMV - a株系对大豆叶片过氧化物酶活性具有迅速的诱导作用,且对抗病品种的诱导程度远大于感病品种。

表 1 接种 SMV- a 株系后各品种大豆叶片过氧化物酶活性 ($\triangle A_{460}^{\circ} \text{mg}^{-1} \text{pro}^{\circ} \text{min}^{-1}$)的变化
Table 1 Changes of peroxidase activity of different soybean cultivat leaves after SMV- a infection

| 品种 Cultivar | 处理 Treatment | 处理小时数 Hours after treatment (h) | | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 8 | 24 | 48 | 72 |
| 科丰 1号 Kefeng- 1 | 未接种 Uninoculated | 0. 257 | 0. 292 | 0. 268 | 0. 536 | 0. 989 |
| | 接种 Inoculation | | 0. 417 | 0. 461 | 1. 139 | 3. 116 |
| | 未接种 Uninoculated | 0. 511 | 0. 576 | 1. 388 | 1. 249 | 1. 192 |
| 1138- 2 | 接种 Inoculation | | 0. 583 | 1. 460 | 1. 351 | 1. 625 |
| | 未接种 Uninoculated | 0. 395 | 0. 441 | 1. 064 | 0. 873 | 1. 494 |
| | 接种 Inoculation | | 0. 468 | 1. 242 | 0. 983 | 2. 689 |

表 2 接种 SMV- a 株系后各品种大豆叶片超氧化物歧化酶 (SOD)和过氧化氢酶 (CAT)活性的变化
Table 2 Changes of superoxide dismutase and catalase activity for each soybean cultivar leaves after SMV- a infection

| 品种 Cultivar | 酶活性 Enzyme activity | 处理 Treatment | 处理小时数 Hours after treatment (h) | | | | | |
|--------------------|---|-----------------|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | | 0 | 8 | 24 | 48 | 168 | 216 |
| 科丰 1号 Kefeng- 1 | SOD | 未接种 | 20. 75 | 15. 44 | 23. 57 | 31. 20 | 55. 80 | 73. 43 |
| | Superoxide dismutase (units° mg ^{- 1} pro) | Uninoculated | | | | | | |
| | | 接种 | | 10. 65 | 12. 31 | 24. 37 | 55. 12 | 48. 12 |
| | CAT | 未接种 | 0. 1073 | 0. 1069 | 0. 1275 | 0. 0673 | 0. 0250 | 0. 0101 |
| | Catalase ($\triangle A_{340}^{\circ} \text{mg}^{- 1} \text{pro}^{\circ} \text{min}^{- 1}$) | Uninoculated | | | | | | |
| | | 接种 | | 0. 0924 | 0. 0525 | 0. 1749 | 0. 0749 | 0. 0144 |
| 徐豆 1号 Xudou- 1 | SOD | 未接种 | 11. 93 | 12. 77 | 23. 22 | 22. 31 | 47. 31 | 50. 06 |
| | Superoxide dismutase (units° mg ^{- 1} pro) | Uninoculated | | | | | | |
| | | 接种 | | 32. 06 | 26. 86 | 26. 73 | 48. 53 | 59. 73 |
| | CAT | 未接种 | 0. 1160 | 0. 1047 | 0. 0410 | 0. 0231 | 0. 0203 | 0. 0171 |
| | Catalase ($\triangle A_{340}^{\circ} \text{mg}^{- 1} \text{pro}^{\circ} \text{min}^{- 1}$) | Uninoculated | | | | | | |
| | | 接种 | | 0. 1081 | 0. 0800 | 0. 1413 | 0. 0309 | 0. 0243 |
| 1138- 2 | SOD | 未接种 | 17. 12 | 28. 16 | 16. 53 | 15. 07 | 37. 80 | 39. 78 |
| | Superoxide dismutase (units° mg ^{- 1} pro) | Uninoculated | | | | | | |
| | | 接种 | | 31. 10 | 17. 97 | 24. 53 | 36. 42 | 42. 16 |
| | CAT | 未接种 | 0. 1135 | 0. 0869 | 0. 0852 | 0. 0964 | 0. 0415 | 0. 0132 |
| | Catalase ($\triangle A_{340}^{\circ} \text{mg}^{- 1} \text{pro}^{\circ} \text{min}^{- 1}$) | Uninoculated | | | | | | |
| | | 接种 | | 0. 2404 | 0. 1613 | 0. 3046 | 0. 0495 | 0. 0165 |

3 接种 SMV- a株系后大豆叶片超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的变化

比较对 SMV 具有不同抗性水平的大豆品种接种 SMV- a株系后超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性变化(见表 2)可知,大豆抗病品种科丰 1号在接种 SMV- a株系后, SOD 活性均显著低于相应对照, CAT 活性在接种 48 小时前也明显低于对照,而感病品种 1138- 2 和徐豆 1 号的变化基本与科丰 1 号相反。

讨 论

许多试验表明苯丙烷类代谢产物-酚类、异黄酮类植保素等次生物质在植物抗病性中起重要作用,而苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶^[4]。本实验结果表明,抗病品种科丰 1号在接种 SMV- a株系后短时间内 PAL 活性就急剧上升,在 48 小时达到最高峰,然后进入活性急剧下降的消退期,相反感病品种 1138- 2 的 PAL 活性均明显低于相应对照(图 1)。说明抗病品种在 SMV- a 侵染的初期能迅速产生足量的苯丙烷类代谢产物,从而产生过敏反应,适应抗病的需要,而感病品种的苯丙烷类代谢在一定程度上受到抑制,因此大豆抗 SMV 性与 SMV 侵染初期的苯丙烷类代谢密切相关。

细胞壁的木质化是植物抗病机制中的主要手段,过氧化物酶(POD 在 Mn^{2+} 的存在下依赖 H_2O_2 氧化松柏醇从而启动木质化链式反应,导致木质素的最终合成。此外,植物体内存在活性氧(Active oxygen species, AOS)产生系统,同时也有相应的清除系统,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等,两者在正常情况下是一个动态平衡的关系。当植物受到病原物侵染时可迅速引起植物体内大量产生 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等活性氧,从而最终导致短暂的氧化迸发(Oxidative burst);已经证实 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等活性氧可以直接杀死病原物,诱导植保素的合成,活性氧也可能作为信号分子激活和调控植物体内防御相关基因的表达^[8]。庄炳昌等人^[1]的研究结果表明,大豆接种 SMV 的后期,感病品种过氧化物酶活性高于对照,而 SOD 活性均比相应的对照低,并出现明显的感病症状。考虑到病原物与寄主的互作过程中,侵染后期的寄主的生理生化变化往往与病原物扩展,伤害寄主组织细胞有关,因此我们测定了大豆叶片接种 SMV 早期的有关活性氧代谢酶类的动态变化。实验结果表明,与感病品种相比,大豆抗病品种科丰 1号在 SMV 侵染早期 POD 活性增加得更快更迅速(表 1),此外我们还发现,在接种 72 小时就首先出现了与木质素合成密切相关的酸性 POD 同工酶(pI4.40)^[5],表明抗病品种可以使细胞壁迅速木质化,从而很快防止病原物侵染后的进一步扩展。实验结果还表明,在 SMV 侵染的 24 小时内,大豆抗病品种科丰 1 号的 SOD 和 CAT 活性均急剧下降(接种 24 小时时比相应的对照下降 47.8% 和 58.8%),而感病品种 1138- 2 在接种 24 小时时 SOD 和 CAT 活性分别比相应的对照上升 9.0% 和 89.3%,徐豆 1 号则上升 15.7% 和 95.1% (表 2),所以大豆抗病品种科丰 1 号在 SMV 侵染早期 SOD 和 CAT 活性的降低可能更加导致 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等活性氧的大量累积,从而与抗病性密切相关。

总之,大豆对 SMV 的抗性机制有多方面的作用,且 SMV 侵染早期的 PAL、SOD、CAT 和 POD 活性变化与抗 SMV 性密切相关。最新的研究表明,植物苯丙烷类代谢产物之一-水杨酸(Salicylic acid, SA)可以通过抑制 CAT 和另一种清除 H_2O_2 的关键酶抗坏

血酸过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase, APX)活性,从而导致 H_2O_2 和水杨酸自由基 (SA^*)的累积,最终使植物产生系统获得性抗性 (Systemic acquired resistance, SAR),而且 SA本身对 POD活性并无影响,相反上述积累的 H_2O_2 可以诱导 POD的活性,有利于细胞壁迅速木质化,大豆抗 SMV是否存在相同的机制我们正在研究之中。

参 考 文 献

- [1] 庄炳昌、徐豹、廖林, 1993,接种大豆花叶病毒后,大豆叶片超氧化物歧化酶、过氧化物酶和蛋白组份的变化,植物病理学报, 23(3): 261– 265
- [2] 徐朗莱、叶茂炳, 1989,过氧化物酶活力连续记录测定法,南京农业大学学报, 12(3): 80– 83
- [3] 沈文飏、叶茂炳、徐朗莱等, 1997,小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化,植物学报, 39(7): 634– 640
- [4] 欧阳光察、薛应龙, 1988,植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控,植物生理学通讯, 24(3): 9– 16
- [5] 沈文飏、徐朗莱、胡蕴珠等, 1997,大豆花叶病毒 (SMV)的侵染对大豆叶片过氧化物酶及其同工酶的影响,南京农业大学学报, 20(4): 88– 92
- [6] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding, Anal Biochem, 72 248– 254
- [7] Koukol, J., E. E. Conn, 1961, The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification, J Biol. Chem, 236 2692– 2698
- [8] Mehdy M. C., 1994, Active oxygen species in plant defense against pathogens, Plant Physiol, 105 467– 472

A PRELIMINARY STUDY ON BIOCHEMICAL MECHANISM OF RESISTANCE TO SMV IN SOYBEAN

Shen Wenbiao Xu Langlai Feng Qing Gao Ling
Hu Yunzhu Sun Junli Zhi Haijian

(College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095)

Abstract

Dynamic changes in activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were tested with leaves of resistant and susceptible soybean cultivars during infection by SMV – a. The results suggested that at the early stage of infection PAL and POD activities of resistant soybean cultivar (Kefeng – 1) increased rapidly, SOD and CAT activities decreased dramatically. On the other hand, the changes of POD were relatively smaller in leaves of susceptible soybean cultivars (1138 – 2 and Xudou – 1), SOD and CAT activities showed an increase and PAL activities of 1138 – 2 declined.

Key words Soybean; Soybean mosaic virus; Biochemical resistant mechanism