

低磷胁迫对不同基因型大豆保护酶活性的影响

吴俊江, 刘丽君, 钟鹏, 林蔚刚, 董德建

(黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨, 150086)

摘要:以磷效率差异显著的垦鉴27(磷高效型)和丰收25(磷低效型)2个品种为供试材料,采用盆栽控制磷供应水平方法研究了不同基因型大豆各生育时期的细胞膜透性、SOD、POD、CAT活性以及MDA积累状况。结果表明:2种基因型大豆在磷供应充足的情况下,保护酶活性差异不显著;低磷胁迫下,丰收25细胞膜透性大幅度升高,相对电导率升高41.01%,MDA含量增加23.43%,保护酶活性明显下降,SOD活性降低12.52%,POD活性降低24.16%,CAT活性降低31.75%;垦鉴27细胞膜透性稍有增加,相对电导率升高19.39%,MDA含量增加14.11%,保护酶活性略有降低,SOD活性降低4.98%,POD活性降低13.21%,CAT活性降低28.81%。由此说明,垦鉴27可以通过对磷素高效利用,提高保护酶(SOD,CAT和POD)活性降低 O_2^- 的产生速率,从而降低细胞膜透性,而丰收25这种自我保护能力较差。

关键词:大豆;基因型;保护酶活性;低磷胁迫

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)03-0437-05

Effects of Low Phosphorus Stress on Activities of Cell Defense Enzymes of Different P-efficiency Soybean

WU Jun-jiang, LIU Li-jun, ZHONG Peng, LIN Wei-gang, DONG De-jian

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

Abstract: Plant cultivars with high phosphorus efficiency adapt to P stress environment easily. Previous studies have focused on the mechanism of rice and wheat's adaptation to low P stress. But effect of low phosphorus stress on activities of cell defense enzymes of different P efficient soybean is less documented. Therefore, pot experiments were conducted in 2006 year, with P high efficient soybean Kenjian 27 and P low efficient soybean Fengshou 25 as materials, to determine effect of low phosphorus stress on activities of cell defense enzymes of different P efficient soybean. The genotypic differences in P uptake efficiency of two soybean varieties were studied under controlled phosphorus (P) nutrition status, endosmosis permeability, superoxide dismutase (SOD), peroxide enzyme (POD) activity, catalase enzyme (CAT) activity, and malondialdehyde (MDA) content of different genotypic soybean growth period were investigated in nutrient solution culture. The difference of activities of cell defense enzymes was not significant under sufficient phosphorus supply. Under low phosphorus stress, endosmosis permeability of Fengshou 25 sharply increased, with conductivity and MDA content increased 41.01% and 23.43%, and activities of cell defense enzymes reduced obviously, with activities of SOD, POD and CAT decreased 12.52%, 24.16%, and 31.75%, respectively; while for Kenjian 27, endosmosis permeability increased slightly and activities of cell defense enzymes were slightly reduced either. Results suggest that phosphorus high efficient soybean Kenjian 27 could make full use of phosphorus, improve activity of cell defense enzymes, depress bringing speed of O_2^- , reduce endosmosis permeability.

Key words: Soybean; Genotype; Activities of cell defense enzyme; Low phosphorus stress

低磷胁迫与植物膜脂过氧化及保护酶系统关系的研究已受到普遍重视。植物在逆境条件下的膜脂

收稿日期:2007-08-01

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD21B01-6);黑龙江省“十一五”科技攻关资助项目(GA06B101-2-5, GA06B101-1-2);黑龙江省自然科学基金资助项目(C2007-13);大豆产业技术体系资助项目;农业部寒地作物生理生态重点开放实验室基金项目。

作者简介:吴俊江(1970-),男,硕士,副研究员,主要从事大豆高产栽培理论与技术研究。E-mail:nkywujj@126.com。

通讯作者:钟鹏,助理研究员。Tel:0451-86684249;E-mail:zhongpengvip@163.com。

过氧化反应和保护酶系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等活性的变化,已广泛用于植物对逆境反应机理的研究^[1]。Fridovich 提出生物自由基伤害学说,认为植物体内自由基大量产生会引发膜脂过氧化作用,造成细胞膜系统破坏,严重时导致植物细胞死亡^[2]。植物细胞中存在着能清除活性氧自由基的保护酶系,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等,它们的协调作用能有效地清除 O_2^- 、 OH^- 、 H_2O_2 等自由基,防御膜脂过氧化,从而使细胞膜免受其伤害^[3]。目前已经有众多的报道证明保护酶活性与植物的低磷有一定的关系^[4-6]。而对于大豆这方面的研究较少,并且缺少系统性研究。以不同磷效率基因型大豆为材料,研究了低磷胁迫条件下大豆不同生育时期叶片保护酶活性,以期为进一步研究大豆适应低磷胁迫机理提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验设计

试验在黑龙江省农业科学院盆栽试验场进行。选用垦鉴 27(磷高效基因型,PH)和丰收 25(磷低效基因型,PL) 2 个不同磷效率基因型的大豆品种为材料。取饱满、无病虫害的大豆种子,经 0.1% $HgCl_2$ 溶液消毒 10 min 后,用蒸馏水反复冲洗干净,在 20% 的 PEG-6000 溶液中吸胀 8 h 后播种。

供试土壤取 100 cm 以下深层黑土和粘土,土壤含有有机质 $5.3 g \cdot kg^{-1}$ 、碱解氮 $32.6 mg \cdot kg^{-1}$ 、速效磷 $2.3 mg \cdot kg^{-1}$ 、速效钾 $45.5 mg \cdot kg^{-1}$,每盆装土 14 kg。试验设施磷(+P)和低磷(-P) 2 个供磷水平共 4 个处理,即磷高效基因型施磷肥(+PH),磷高效基因型不施磷肥(-PH),磷低效基因型施磷肥(+PL),磷低效基因型不施磷肥(-PL)各处理重复 4 次。施磷处理每盆磷酸二铵 $0.33 g \cdot kg^{-1}$,尿素 $0.11 g \cdot kg^{-1}$,硫酸钾 $0.15 g \cdot kg^{-1}$,低磷处理施入尿素 $0.11 g \cdot kg^{-1}$,硫酸钾 $0.15 g \cdot kg^{-1}$,不施磷肥。肥料分底肥和追肥两次施入。底肥施入总施肥量的 2/3,追肥施入总施肥量的 1/3。采用随机区组排列,3 次重复。2006 年 5 月 1 日播种,在适宜水分下大豆出苗后各生育时期取样测定各项指标。

1.3 测定内容与方法

1.3.1 细胞膜透性 电导仪法,用 DDS-307 电导率仪测定电导率,经换算获得细胞膜透性指标^[7]。

1.3.2 丙二醛(MDA)含量 用硫代巴比妥(TBA)提取法^[8]。

1.3.3 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性测定^[7-9]。

酶液的制备:取 0.5 g 新鲜大豆叶片,放入置于冰浴的研钵中,加入少量的石英砂及 $0.05 mol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.8 含 1% PVP)研磨提取,研磨后再补加 8 mL 缓冲液。匀浆,用纱布过滤后于 $12\ 000 r \cdot min^{-1}$ 冷冻离心机 10 min,上清液为酶粗提液,用于测定 SOD、POD、CAT 活性。

SOD 活性测定:参照 Heath 和 Bewley 抑制 NBT 光化还原法。

POD 活性测定:参照张宪政的方法,略有改动。反应混合液中有 pH5.0 醋酸缓冲液 1 mL,0.1% 邻甲氧基苯酚 1 mL 及酶液 1 mL 摇匀后置于 30℃ 恒温水浴中 5 min 达平衡后,立即加入 0.08% H_2O_2 溶液 1 mL 并混匀,1 min 后立即在波长 470nm 处比色。

CAT 活性测定:紫外吸收法。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫对大豆细胞膜透性的影响

垦鉴 27 和丰收 25 在低磷胁迫下,细胞膜透性变化如图 1。低磷胁迫能使两磷效率基因型大豆整个生育时期相对电导率增加,-PH 与 +PH 相比,相对电导率增加了 19.39%,细胞膜透性变化不显著;而 -PL 与 +PL 相比,相对电导率增加了 41.01%,细胞膜变化呈极显著水平;+PH 与 +PL 相比,相对电导率变化无显著性差异。开花期前低

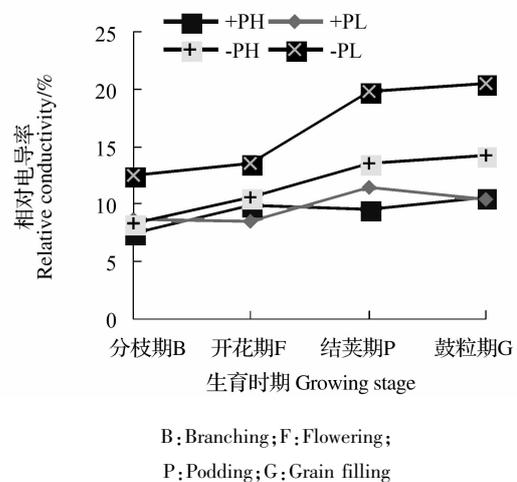


图 1 低磷胁迫下相对电导率变化

Fig. 1 Change of relative conductivity under low phosphorus stress

磷处理细胞膜透性变化不明显;在开花期到结荚期间,低磷处理细胞膜透性变化显著;在结荚期到鼓粒期间,低磷处理细胞膜透性变化不明显。说明在磷素缺乏下,磷高效基因型垦鉴 27 细胞膜结构破坏程度相对较小,而对磷低效基因型丰收 25 细胞膜结构破坏程度较大,致使电解质大量外渗,导致细胞内部环境破坏,生理功能代谢紊乱。因此,低磷胁迫下,细胞膜结构破坏程度依次为 $-PL > -PH > +PL > +PH$ 。

2.2 低磷胁迫对大豆 SOD 活性的影响

不同磷效率基因型大豆在低磷胁迫下 SOD 活性变化如图 2 所示,从整个生育时期分析,低磷胁迫能使大豆细胞中 SOD 活性降低, $-PH$ 与 $+PH$ 相比, SOD 活性下降了 4.98%, $-PL$ 与 $+PL$ 相比下降了 12.52%。 $+PH$ 与 $+PL$ 相比, SOD 活性变化无显著性差异。开花期前低磷处理 SOD 活性变化不明显;在开花期到结荚期间,低磷处理 SOD 活性下降明显;在结荚期到鼓粒期间,低磷处理 SOD 活性趋于平稳。

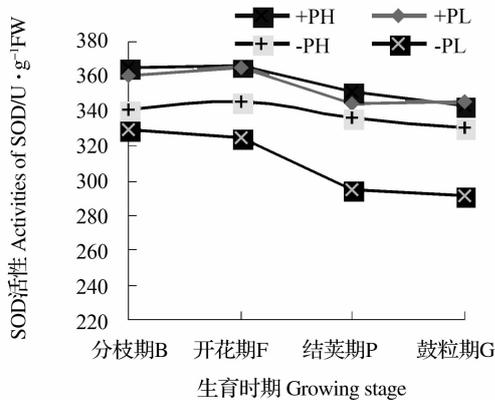


图2 低磷胁迫下 SOD 活性动态变化

Fig. 2 Change of activities of SOD under low phosphorus stress

2.3 低磷胁迫对大豆 POD 活性的影响

从图 3 看出,低磷胁迫能使大豆叶片细胞内 POD 活性降低, $-PH$ 与 $+PH$ 处理相比较, POD 活性降低了 13.21%, $-PL$ 与 $+PL$ 处理相比降低 24.16%。

$+PH$ 与 $+PL$ 相比, POD 活性变化无显著性差异。在整个生育时期,低磷处理的 POD 活性变化与 SOD 相似。

2.4 低磷胁迫对大豆 CAT 活性的影响

从图 4 看出,低磷胁迫能使大豆叶片细胞内

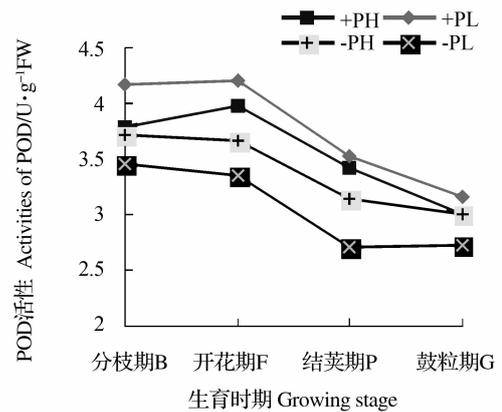


图3 低磷胁迫下 POD 活性动态变化

Fig. 3 Change of activities of POD under low phosphorus stress

CAT 活性降低, $-PH$ 与 $+PH$ 处理相比较, CAT 活性降低了 28.81%, $-PL$ 与 $+PL$ 处理相比降低 31.75%。

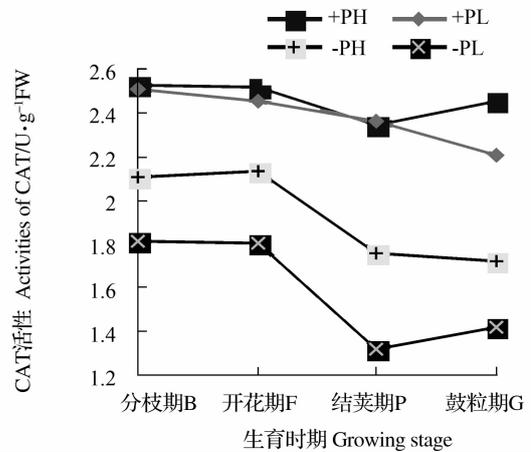


图4 低磷胁迫下 CAT 活性动态变化

Fig. 4 Change of activities of CAT under low phosphorus stress

$+PH$ 与 $+PL$ 相比, CAT 活性变化无显著性差异。在整个生育时期,低磷处理的叶细胞中 CAT 酶活性的变化速率不同于 POD 与 SOD, 它以一个较高的水平迅速下降到一个很低的水平。

2.5 低磷胁迫对大豆 MDA 含量的影响

从表 1 可以看出,低磷胁迫能使大豆叶片中 MDA 含量升高, $-PH$ 与 $+PH$ 相比, MDA 含量升高了 14.11%, 但差异性不显著;而 $-PL$ 与 $+PL$ 相比, MDA 含量升高 23.43%, 差异达极显著水平; $+PH$ 与 $+PL$ 相比, MDA 含量无显著性差异, 与细胞膜透性变化趋于一致。

表 1 不同处理下 MDA 含量动态变化及差异显著性分析

Table 1 Change of content of MDA and the significance tests under different treatment

处理 Treatment	丙二醛平均含量 Content of MDA/nmol · g ⁻¹ FW			
	分枝期 Branching	开花期 Flowering	结荚期 Podding	鼓粒期 Grain filling
- PL	56.95a A	56.56a A	69.95a A	69.88a A
- PH	50.76b AB	51.85b AB	60.75b AB	60.55b B
+ PL	47.75b B	47.91bc B	49.26c B	49.07c C
+ PH	47.15b B	47.85c B	48.45c B	48.85c C

不同小写字母间表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母间表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Lowercase and capital letters are significant at 5% or 1% level, respectively.

3 讨论

MDA 是膜脂过氧化作用的主要产物之一, 具有很强的细胞毒性, 对膜和细胞中的许多生物功能分子如蛋白质, 核酸和酶等均有很强的破坏作用, 并参与破坏生物膜的结构与功能。MDA 含量高低和细胞质膜透性变化是反映细胞膜脂过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标。在低磷处理大豆整个生育时期的过程中, MDA 含量变化趋势与膜透性的变化趋势相似, 可以认为是膜脂的过氧化引起了膜的损伤; 低磷胁迫能使 MDA 含量的增加, 而不断积累, 导致大豆植株的衰老进程在加速。但磷高效基因型垦鉴 27 MDA 含量的积累是逐渐达到显著水平的, 所以保护能力或修复能力强, 生物膜受损程度低, 有缓冲功能, 细胞膜脂过氧化程度较小。而磷低效基因型丰收 25 在较短的时间内积累了大量的 MDA, 则保护能力或修复能力相对较低, 因而受损非常严重, 从而膜的透性增大。所以对生物膜自我保护或修复能力的强弱也是不同基因型重要差别^[10]。因此, 大豆高产栽培技术中在鼓粒期要喷施大量的磷肥来补充大豆植株体内磷的含量, 促使生理正常代谢。

SOD、CAT 和 POD 等酶类是细胞抵御活性氧伤害的重要保护酶系统, 它们在清除超氧自由基、过氧化氢和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面起着重要作用。超氧化物歧化酶以催化 O_2^- 发生歧化作用起到清除 O_2^- 的解毒作用, 超氧化物歧化酶将 O_2^- 歧化产生的 H_2O_2 由细胞内 CAT 和 POD 清除。结果表明, 几种保护酶活性在低磷处理期间都有变化, SOD 和 POD 变化相似, 在开花期到结荚期间, 低磷处理酶活性下降明显; 在结荚期到鼓粒期间, 低磷处理 SOD 活性趋于平稳。在整个生育时期, 低磷处理的叶细胞中 CAT 酶活性的变化速率不同于 POD 与 SOD, 它以一个较高的水平迅速下降到

一个很低的水平。由于 CAT 既可清除体内过量的 H_2O_2 , 又是脂肪酸 β -氧化的参与酶, 由此说明 CAT 活性的急剧降低有可能是由于它多功能原因造成的^[11]。说明在低磷胁迫下, 大豆体内保护酶系统的活力和平衡受到破坏, 使活性氧累积, 启动并加剧膜脂过氧化而造成整体膜的损伤。磷高效基因型对保护酶系统的动态平衡影响较小, 变化也很平缓, 对膜脂的过氧化及膜透性的影响也较小^[12-13]。保护酶系统对自由基的清除能力的变化可能是植物抗逆性的共同机制。植物体在逆境胁迫下保护酶的作用, 可能是通过它们之间相互协调且保持一个稳定的平衡态所进行的^[14-15]。

4 结论

研究表明, 低磷胁迫对不同磷效率基因型大豆叶片中不同抗氧化酶的活性的影响程度不同。

低磷胁迫使大豆叶片中 MDA 含量的增加明显高于正常磷处理, 但磷高效基因型品种 MDA 含量增加的幅度明显小于磷低效基因型品种, 说明低磷引起了大豆体内活性氧的积累和膜脂过氧化作用的加剧, 而磷高效基因型品种在低磷胁迫时膜脂受到的伤害要相对轻一些。

低磷胁迫导致活性氧清除系统中的 SOD、POD、CAT 活性降低, 但磷高效基因型品种叶片中的保护酶活性降低的幅度小于磷低效基因型品种; 表明磷高效基因型品种在磷胁迫下 O_2^- 的产生速率可能要小些, 对 H_2O_2 的清除能力强, 抗氧化能力强。磷低效基因型品种叶片的老化程度要高于耐低磷品种, 吸收磷和其它养分的能力较弱。

参考文献

- [1] Bowler C, van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83-116.

- [2] Fridovich I. Superoxide dismutase [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1975, 44: 147-159.
- [3] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学 [M]. 上海: 科学出版社, 1999: 375-380. (Yu S W, Tang Z C. *Plant physiology and molecular biology* [M]. Shanghai: Science Press, 1999: 375-380.)
- [4] 刘厚诚, 邝炎华, 陈日远. 缺磷胁迫下长豇豆幼苗膜脂过氧化及保护酶活性的变化 [J]. *园艺学报*, 2003, 30(2): 215-217. (Liu H C, Kuang Y H, Chen R Y. Changes of lipid peroxidation and activities of protective enzymes in asparagus bean seedling under phosphorus-deficiency stress [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(2): 215-217.)
- [5] 潘晓华, 刘水英, 李锋, 等. 低磷胁迫对不同水稻品种叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响 [J]. *中国水稻科学*, 2003, 17(1): 57-60. (Pan X H, Liu S Y, Li F, et al. Effect of low-phosphorus stress on membrane lipid peroxidation and protective enzyme activities in rice leaves of different cultivars [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2003, 17(1): 57-60.)
- [6] 李锋, 李木英, 潘晓华, 等. 不同水稻品种幼苗适应低磷胁迫的根系生理生化特性 [J]. *中国水稻科学*, 2004, 18(1): 48-52. (Li F, Li M Y, Pan X H, et al. Biochemical and physiological characteristics in seedlings roots of different rice cultivars under low-phosphorus stress [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2004, 18(1): 48-52.)
- [7] 邹琦. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 59-60, 173-175. (Zou Q. *Guide of phytophysiological experiment* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 59-60, 173-175.)
- [8] 张宪政. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 5-96. (Zhang X Z. *Guide of phytophysiological experiment* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 5-96.)
- [9] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 5-8. (Zhang Z L. *Guide of phytophysiological experiment* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 5-8.)
- [10] 孙彩霞, 刘志刚, 荆艳东. 水分胁迫对玉米叶片关键防御酶系活性及其同工酶的影响 [J]. *玉米科学*, 2003, 11(1): 63-66. (Sun C X, Liu Z G, Jing Y D. Effect of water stress on activity and isozyme of the major defense-enzyme in maize leaves [J]. *Journal of Maize Science*, 2003, 11(1): 63-66.)
- [11] 张士功, 刘国栋. 低磷和干旱胁迫对小麦生长发育影响的研究初探 [J]. *西北植物学报*, 2002, 22(3): 574-578. (Zhang S G, Liu G D. Effects of low-phosphorus and drought stresses on growing of wheat [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(3): 574-578.)
- [12] 钟鹏, 宋占林, 李志刚, 等. 干旱和低磷胁迫对大豆叶保护酶活性的影响 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(2): 153-155. (Zhong P, Zhu Z L, Li Z G, et al. Effects of low-phosphorus and drought stresses on protective enzyme activities of soybean [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(2): 153-155.)
- [13] 张玉霞, 李志刚, 钟鹏. 缺磷胁迫对大豆膜脂过氧化及保护酶活性的影响 [J]. *中国农学通报*, 2004, 20(4): 196-198. (Zhang Y X, Li Z G, Zhong P. Influence of lipid peroxidation and activities of protective enzymes in soybean under phosphorus deficiency stress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 20(4): 196-198.)
- [14] Giannopolitis C N, Ries S K. Uperoxide dismutases. Purification and quantitative relationship with soluble protein in seeding [J]. *Plant Physiology*, 1977, 59: 315-318.
- [15] 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 渗透胁迫对水稻膜脂过氧化及体内保护酶系统的影响 [J]. *植物生理学报*, 1991, 17(1): 80-84. (Jing M Y, Jing J H, Wang S T. Influence of lipid peroxidation and activities of protective enzymes in rice under osmotic stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1991, 17(1): 80-84.)
- (上接第 436 页)
- [9] 王丽霞, 任志远. 山西省大同市农业生态气候适宜度评价 [J]. *地理研究*, 2007, 26(1): 53-59. (Wang L X, Ren Z Y. Appraisal and analysis of agriculture eco-climatic amenity in Datong city of Shanxi province [J]. *Geographical Research*, 2007, 26(1): 53-59.)
- [10] 张静. 作物—地域多种组合中作物生态适宜性评价与权重配置方法的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005: 15-39. (Zhang J. Study on the weight endowing and crops eco-adaptability evaluation in the in varies combinations of crops and regions [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005: 15-39.)
- [11] 陈立亭. 黑龙江省气候与农业 [M]. 北京: 气象出版社, 2004: 15-35. (Chen L T. *Climate and agriculture in Heilongjiang province* [M]. Beijing: Meteorological Press, 2004: 15-35.)
- [12] 王夫玉, 张洪程, 赵新华. 温光对水稻籽粒充实度的影响 [J]. *中国农业科学*, 2001, 34(4): 396-402. (Wang F Y, Zhang H C, Zhao X H. Study on the effects of temperature and illumination on grade of filled grain in rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2001, 34(4): 396-402.)
- [13] 石惠恩, 李春喜. 小麦中后期灌溉对产量和营养品质的影响 [J]. *河南职业技术师范学院学报*, 1989, (Z1): 108-112. (Shi H E, Li C X. Effects of irrigation at middle final stage on the grain yield and nutrient quality of winter wheat [J]. *Journal of Henan Vocation-technical*, 1989, (Z1): 108-112.)
- [14] 黄策, 王天铎. 水稻群体物质生产过程的计算机模拟 [J]. *作物学报*, 1986, 12(1): 1-8. (Huang C, Wang T Z. Computer simulation of biomass production in rice community [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1986, 12(1): 1-8.)