

野生大豆抗花叶病毒病生化机制的研究

李开盛, 曹越平

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要:以具有不同 SMV 抗性的 2 个野生大豆和 2 个栽培大豆为材料, 分析其感染大豆花叶病毒株系 SMV-N3 后苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的动态变化, 比较了野生大豆与栽培大豆抗病机制的差异。结果表明:抗病品种感染病毒后, 叶片中各酶活性比对照高, 感病品种比对照低;野生大豆酶活性变化比较缓慢, 栽培大豆酶活性变化比较迅速, 但趋势大体一致;大豆对机械损伤与病毒侵染防御途径部分重叠, 但存在较大差异。

关键词:野生大豆;大豆花叶病毒;抗病性;苯丙氨酸解氨酶;过氧化物酶;超氧化物歧化酶

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)02-0254-05

Biochemical Mechanism of Resistance to SMV in Wild Soybean(*Glycine soja.*)

LI Kai-sheng, CAO Yue-ping

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Two wild soybean lines and two cultivated soybean varieties with different resistance to soybean mosaic virus were infected with SMV strain N3, and the activities of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Peroxidase (POD) and Superoxide Dismutase (SOD) in leaves were assayed and the differences of resistance in two subspecies were compared. The results indicated that the activities of defense enzymes in the resistant soybean variety were higher than that of the control, and the susceptible variety was in reverse. The change of enzymes activity was similar, but which in cultivated soybean was faster than that in wild soybean. The defense pathway between wounding and virus invasion was partly overlapping, but the mechanism varied a lot.

Key words: *Glycine soja*; Soybean mosaic virus; Resistance; PAL; POD; SOD

大豆花叶病毒是大豆生产上的主要病害之一,严重影响大豆的产量与品质,而抗病育种是控制其危害的重要途径。野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆(*Glycine max*)的近缘祖先种^[1],具有高蛋白、多抗、广适应性和繁殖系数高等优良性状,可与栽培大豆相互杂交,且后代可育^[2]。野生大豆和栽培大豆病毒病的毒源相同,都是大豆花叶病毒^[3],因此利用野生大豆创造新的抗病毒病种质,拓宽大豆育种的遗传基础具有重要意义^[4]。

植物在逆境或病原物的诱导下,体内的各种防御酶,参与活性氧清除及酚类、木质素和植保素等抗病相关物质的合成,抵御活性氧及氧自由基对细胞膜系统的伤害,激发植物的抗逆和抗病反应^[5],增强植物对病原物的抵抗能力^[6]。植物保护自身防止病原物对其伤害的反应就是复杂的新陈代谢过程,其生理反应是通过一系列的酶催化作用来实现的^[7]。

大豆的抗花叶病毒病机理与其体内代谢的变化有关,但由于野生大豆长期生活于野生环境下,遗传背景复杂,对这方面的研究还不多。该文通过对野生大豆与栽培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)活性动态变化的比较,初步研究了野生大豆抗花叶病毒与生化指标的关系,为深入开展野生大豆抗花叶病毒的机理研究和筛选抗病品种提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

野生大豆 SRY8(抗 SMV-N3 株系,无症状)与 SRY38(感 SMV-N3 株系,呈系统花叶症状)由上海交通大学大豆种质资源课题组提供,栽培大豆中品 95-5383(抗 SMV-N3 株系,无症状)由中国农业科学院作物研究所提供,合丰 25(感 SMV-N3 株系,呈系

收稿日期:2011-02-14

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2006BAD13B05-9)。

第一作者简介:李开盛(1981-),男,博士,研究方向为植物遗传育种。E-mail:lis327@126.com。

通讯作者:曹越平(1967-),女,教授,博士生导师,从事大豆遗传育种研究。E-mail:yuepingcao@sjtu.edu.

统花叶症状)由东北农业大学大豆研究所提供。

大豆花叶病毒株系(SMV-N3)由东北农业大学李文滨教授提供,接种在感病品种1138-2上繁殖,待症状明显时采收典型症状的嫩叶作接种毒源(置于无虫网室)。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 每个参试品种播30盆(直径15 cm的盆钵,置于无虫网室),每盆10株,其中10盆接种SMV-N3株系,10盆作为划伤处理对照,10盆作缓冲液处理对照。待幼苗的真叶充分展平后,接种SMV-N3株系,接种前研钵、研棒用洗洁剂洗净,在微波炉中高温消毒3 min,刷子用洗洁剂洗净。取新鲜病叶,加磷酸缓冲液,按每克新鲜病叶加3~5 mL磷酸缓冲液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0)的比例,并加入适量金刚砂(600目),在研钵中研磨成匀浆供接种使用,采用常规人工磨擦接种方法接种大豆花叶病毒。在接种后1、3、5、7、9、11、13 d分别取叶龄相同的样品,每份样品称重后,存放于超低温冰箱。

1.2.2 酶活性测定 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的提取与测定:取叶片0.5 g,加5 mL含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的巯基乙醇的硼酸缓冲液,0.02 g聚乙炔吡咯烷酮(PVP),液氮研磨,在 4°C $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,上清液即为粗酶液。取1 mL酶液,加1 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯丙氨酸,2 mL蒸馏水,总体积为4 mL。对照不加酶液,而多加1 mL蒸馏水。反应液置恒温水浴 30°C 中保温,30 min后用紫外分光光度计在290 nm波长处测定吸光度。以每小时在290 nm波长处吸光度变化0.01所需的酶量为1个单位(相当于每毫升反应混合物形成 $1 \mu\text{g}$ 肉桂酸)。

过氧化物酶(POD)的提取测定:取叶片0.5 g,加0.02 g聚乙炔吡咯烷酮(PVP),液氮研磨,加入6 mL $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 预冷的磷酸缓冲液(pH 6.0),于 4°C 下 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,上清液即为粗酶液,取上清液100 μL ,用1 mL缓冲液稀释。POD活性测定采用愈创木酚法:取光径为1 cm比色杯2支,其中一支加入反应混合液3.9 mL, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.1 mL作为校零对照;另一支加入反应混合液3.9 mL,酶液0.1 mL,立即开启秒表,记录时间,与分光光度计下测量波长470 nm处的吸光度,每隔30 s读一次数,记录 OD_{470} 。以每分钟每毫克鲜重OD值变化0.01所需的酶量为1个酶活单位。

超氧化物歧化酶(SOD)的提取与测定:取叶片0.5 g,加入4 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.8),

液氮研磨,于 4°C 下 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液为粗酶液。SOD活性测定采用氮蓝四唑法:在透明试管中依次加入 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液1.5 mL、 $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲硫氨酸(Met)溶液0.3 mL、 $750 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氮蓝四唑(NBT)溶液0.3 mL、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 溶液0.3 mL、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素0.3 mL、酶液0.05 mL、蒸馏水0.25 mL(以上各溶液均在用前配制,避光放置),2个对照管以缓冲液代替酶液。将溶液混匀后,在光照培养箱内照光10 min,取出试管,迅速测定 OD_{560} 值,以不加酶液的照光管为对照。SOD活性计算, $\text{SOD活性} = [(\text{OD}_0 - \text{OD}_s) V_T] / [0.5 \text{OD}_0 \cdot \text{FW} \cdot V_1]$,式中SOD总活性为每克鲜重含酶单位数($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$),SOD比活力单位为每毫克蛋白酶单位数($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$), OD_0 为照光对照管的光吸收值, OD_s 为样品管的光吸收值, V_T 为样品总体积(mL), V_1 为测定时样品用量,FW为样品鲜重(g)。

2 结果与分析

2.1 接种SMV-N3对供试品种PAL活性的影响

供试材料的PAL活性变化趋势差异较大(图1),SRY8接种SMV后PAL活性缓慢上升,且分别在接种后第7天和第11天出现2个峰值,其活性在第7天是缓冲液处理的1.92倍、划伤处理的1.52倍,第11天是缓冲液处理的1.07倍、划伤处理的1.38倍;而中品95-5383在接种SMV后第5天突然上升并达到最高峰,其活性是缓冲液处理的5.78倍、划伤处理的9.04倍,然后逐渐显著下降;二者的对照表现相似,划伤处理略高于缓冲液处理且差异不明显。SRY38接种SMV后PAL活性变化显著,且与2个对照三者之间在不同时间点上互有高低,而合丰25接种SMV后PAL活性在初期变化不大,在第9天突然上升,然后降低,并且与2个对照间无显著差异。

2.2 接种SMV-N3对供试品种POD活性的影响

从图2可以看出,SRY8与中品95-5383接种SMV后POD的活性变化十分相似,均迅速增加,且活性始终维持在较高的水平,不同的是SRY8在接种SMV后POD活性在第3天和第7天出现2次高峰,并且其活性在第3天是缓冲液处理的1.66倍、划伤处理的1.70倍,在第5天是缓冲液处理的1.34倍、划伤处理的1.52倍;而中品95-5383在接种SMV后第5天出现高峰,其活性是缓冲液处理的3.90倍、划伤处理的1.86倍,然后稳步减弱。SRY8的缓冲液处理和划伤处理的POD活性差异不明显,而中品95-5383则表现为缓冲液处理高于划

伤处理,且差异明显。SRY38 与合丰 25 接种 SMV 后 POD 活性变化相似,酶活性略高于对照但差异不明显;SRY38 在接种 SMV 后 POD 活性迅速下降且

在第 3 天达到最低,然后缓慢上升,而合丰 25 变化较小;SRY38 划伤处理的酶活性略高于缓冲液处理,合丰 25 则相反,且差异不明显。

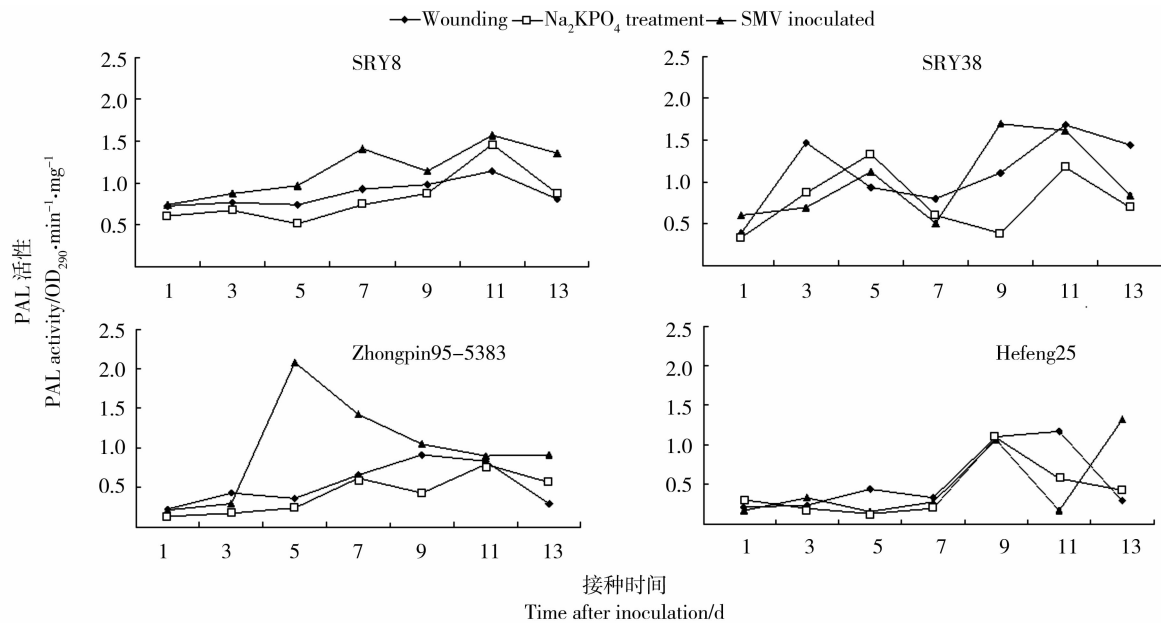


图1 野生大豆与栽培大豆叶片中 PAL 的活性变化

Fig.1 Change of PAL activity in *Glycine soja* and *Glycine max* leaves

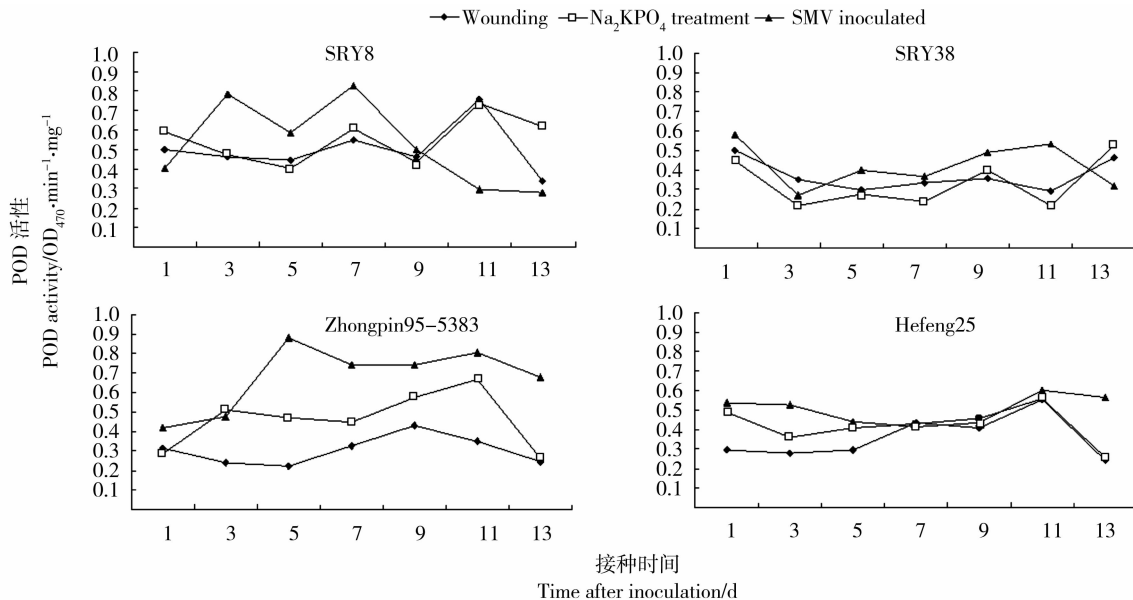


图2 野生大豆与栽培大豆叶片中 POD 的活性变化

Fig.2 Change of POD activity in *Glycine soja* and *Glycine max* leaves

2.3 接种 SMV-N3 对供试品种 SOD 活性的影响

供试材料 SOD 的活性水平变化较小(图 3), SRY8、SRY38 和中品 95-5383 接种 SMV 后变化趋势相似,总体上呈先上升然后缓慢下降的趋势,并在接种后第 3 天达到峰值;SRY8 与中品 95-5383 接种 SMV 后的酶活性高于对照,而 SRY38 低于对照;在接种 SMV 后第 3 天 SRY8 的 SOD 活性是缓冲液处理的 1.19 倍、划伤处理的 1.22 倍,中品 95-5383

的 SOD 活性是缓冲液处理的 1.22 倍、划伤处理的 1.22 倍,而 SRY38 的 SOD 活性是缓冲液处理的 75.6%、划伤处理的 85.7%。合丰 25 接种 SMV 后的酶活性水平呈持续缓慢下降趋势并且显著低于 2 个对照,在第 9 天与 2 个对照差异最大分别是缓冲液处理的 55.6%、划伤处理的 80%,且划伤处理的酶活性高于缓冲液处理。

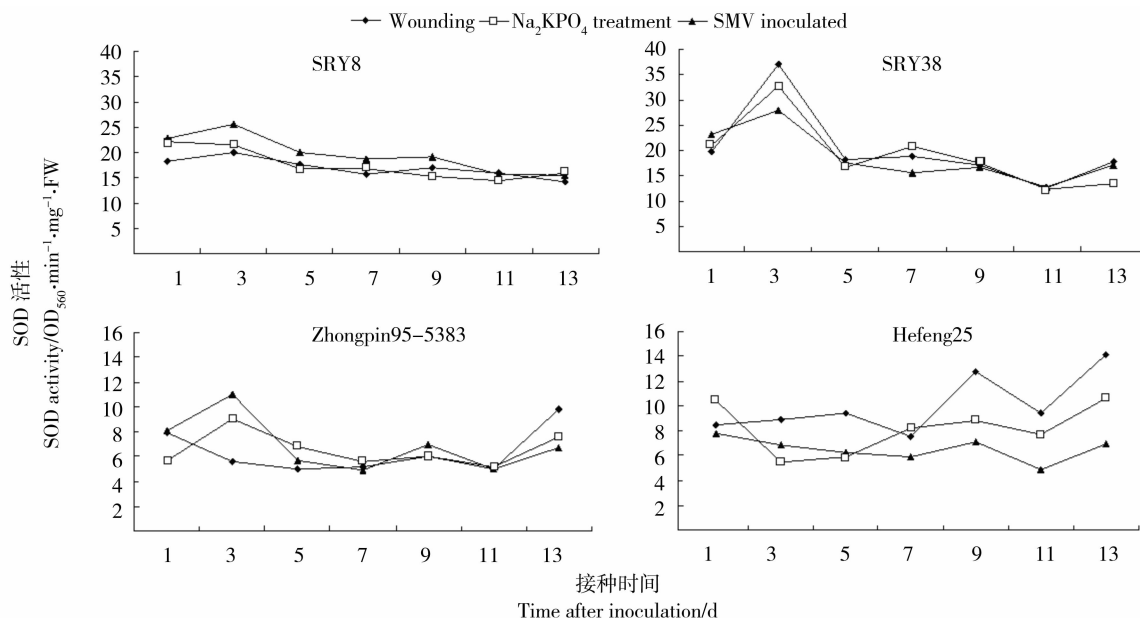


图3 野生大豆与栽培大豆叶片中 SOD 的活性变化

Fig. 3 Change of SOD activity in *Glycine soja* and *Glycine max* leaves

3 讨论

病原菌与植物的非亲和性互作过程中,会给植物造成逆境,引起一种特殊抗病的过敏性反应,导致植物体内 PAL、POD、SOD 等膜保护酶系及内源激素的含量和活性发生变化。

苯丙氨酸解氨酶是苯丙烷类代谢途径的关键酶,它的活性与酚类化合物的合成密切相关。酚类物质本身具有抗菌素的性质,由酚类物质氧化而成的醌类物质是潜在的抗病因子^[8]。试验结果表明,野生大豆与栽培大豆抗病品种在接 SMV 以后 PAL 活性变化趋势一致,且高于对照,而感病品种的 PAL 活性低于对照,说明大豆花叶病毒侵染后抗病品种能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。

植物体内重要的活性氧清除酶类 POD,是将 H₂O₂ 降解成为无毒害的 H₂O 和 O₂,因此这些酶系统就成为植物在逆境中的保护体系^[9],维持体内的活性氧代谢平衡,保护膜结构,从而使植物能在一定程度上忍耐、减缓或抵抗逆境胁迫^[10]。大豆感染 SMV 后,叶片 POD 活性上升,上升幅度因品种抗性水平而异,抗病品种上升幅度大,感病品种上升幅度小,且抗病品种明显高于感病品种,野生大豆与栽培大豆 POD 酶活性变化表现基本一致,说明野生大豆与栽培大豆的抗病过程保持一致,但栽培大豆 POD 酶活性出现 1 次高峰,而野生大豆出现 2 次高峰,表明野生大豆与栽培大豆的 POD 酶活性存在细微差别。

植物体内存在活性氧清除系统,SOD 是植物体内防御活性氧毒性的保护酶,它能清除超氧化物阴离子自由基,提高植物抗逆性^[11]。感染 SMV 后抗病品种大豆 SOD 活性先急剧上升达到最高峰后缓慢下降,且活性高于对照,而感病品种 SOD 活性低于对照,说明 SOD 在大豆抗 SMV 侵染的过程中起着重要作用,并且在不同抗性中表现出明显的差异,并且不同抗、感品种 SOD 活性变化在野生大豆与栽培大豆中的表现极为相似,说明在大豆的长期进化过程中 SOD 在抗病反应方面没有发生变化。

不同抗性野生大豆材料的氧化酶活性变化存在明显的差异,且与栽培大豆的变化规律基本一致,但野生大豆材料的酶活性变化比较缓慢而栽培大豆则比较剧烈,可能是因为野生大豆与栽培大豆原为同一物种,它们有着相同的抗病途径,由于人们的长期选择,造成二者对花叶病毒不同的选择压,从栽培大豆易筛选出对花叶病毒特异抗性的品种,而野生大豆长期生存于自然状态下,自然的选择比较漫长且病原较少,一旦遇到病原侵害造成抗病机制调控混乱,因此其抗病途径比较复杂,从而形成了二者间抗病性上的差异。

划伤、缓冲渗透液处理、病原物处理可以诱导植物反映的交迭,在烟草中创伤和水杨酸都可以诱导蛋白激酶^[12],这些激酶也可以被其它胁迫所诱导,包括划伤、水杨酸盐、TMV 侵染^[12-14]。花叶病毒侵害植物的方式主要是以蚜虫或机械损伤后造成伤口感染的方式传播,而蚜虫属刺吸式口器,造成植物表面损伤后将带毒汁液注入植物体内进而传播毒害。该试验采用模仿在自然情况下植物受到

病原物侵染而感病的过程,即将叶片划伤,然后将含有病毒粒子的缓冲液涂抹其上,因此该试验比以往类似研究多加了一次对照处理。结果表明,病毒胁迫与机械损伤胁迫的最后反应是不同的。机械胁迫比基因诱导更加短暂,说明最后的结果不同可能是由于相同的途径成分和基因诱导激活持续时间和表达量的不同。大豆抗病基因在识别病毒后导致大量的活性氧和下游抗病基因元件表达,活性氧的表达似乎是抗病基因表达的一个辅助,虽然缓冲液处理也有活性氧变化,但不如病毒混合液的诱导明显,说明机械胁迫与病毒处理虽然有部分途径重叠,但还是有很大的差别。

野生大豆与栽培大豆虽然在抗 SMV 各主要活性酶的变化上存在细微差别,但抗病的生理生化机制基本一致,说明野生大豆可以成为抗 SMV 育种的可靠种质资源。下一步需要对野生大豆抗花叶病毒的分子机理进行研究,以明确抗病途径,更有效的利用野生大豆资源,培育出新的抗病大豆品种。

参考文献:

- [1] 李福山. 中国野生大豆资源的地理分布及生态分化研究[J]. 中国农业科学, 1993, 26(2): 47-55. (Li F S. Studies on the ecological and geographical distribution of the Chinese resources of wild soybean (*G. soja*) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1993, 26(2): 47-55.)
- [2] 徐豹. 中国野生大豆 (*G. soja*) 研究十年[J]. 吉林农业科学, 1989, (1): 5-13. (Xu B. A decade of wild soybean (*G. soja*) research in China[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 1989 (1): 5-13.)
- [3] 胡吉成, 谢淑仪. 野生大豆病毒病的初步鉴定[J]. 植物病理学报, 1984, 14(2): 122-123. (Hu J C, Xie S Y. Preliminary identification of wild soybean (*Glycine Soja*) virus diseases[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1984, 14(2): 122-123.)
- [4] 孙永吉, 刘玉芝, 胡吉成, 等. 野生大豆抗花叶病毒病研究[J]. 大豆科学, 1991, 10(3): 212-216. (Sun Y J, Liu Y Z, Hu J C, et al. A study on resistance of the wild soybeans to soybean mosaic virus (SMV) [J]. Soybean Science, 1991, 10(3): 212-216.)
- [5] Ingeborg T, Christiane L, Alok K S. Cyclopentenone Isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants [J]. The Plant Journal, 2003, 34(3): 363-368.
- [6] Fridovich L. The biology of oxygen radicals. The superoxide is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutase provide an important defense [J]. Science, 1978, 201: 875-880.
- [7] Dangl J. Plants just say NO to pathogens [J]. Nature, 1998, 394: 525-527.
- [8] Luca P, Odette R, Bernard F, et al. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco, molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor [J]. Plant Physiology, 1994, 106: 877-886.
- [9] Mona C M. Active oxygen species in plant defense against pathogens [J]. Plant Physiology, 1994, 105: 467-472.
- [10] Przemyslaw W. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection [J]. Biochemistry, 1997, 322: 681-692.
- [11] 龚国强, 于梁, 周山涛. 低温对黄瓜果实超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响 [J]. 园艺学报, 1996, 23(1): 97-98. (Gong G Q, Yu L, Zhou S T. Effect of low temperature on superoxide dismutase (SOD) in cucumber fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23(1): 97-98.)
- [12] Romeis T, Piedras P, Zhang S Q, et al. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses [J]. Plant Cell, 1999, 11: 273-287.
- [13] Scheel D. Resistance response physiology and signal transduction [J]. Current Opinion Plant Biology, 1998, 1: 305-310.
- [14] Zhang S, Klessig D F. Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection [J]. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 1998, 95: 7433-7438.
- [10] 张俊立, 彭德良, 克强. 河北省大豆胞囊线虫分子鉴定及其分布 [J]. 植物保护, 2005, 31(1): 40-43. (Zhang J L, Peng D L, Ke Q. Molecular identification and distribution of *Heterodera glycines* in Hebei [J]. Plant Protection, 2005, 31(1): 40-43.)
- [11] Miller D R, Chen S Y. The effect of soil pH on soybean cyst nematode reproduction [J]. Phytopathology (Abstract), 2002, 92(6): S56.
- [12] Anand S C. Effect of soil temperature and pH on resistance of soybean to *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 1995, 27(4): 478-482.
- [13] 计钟程, 许文芝. 重茬大豆减产与土壤环境变化 [J]. 大豆科学, 1995, 14(4): 321-328. (Ji Z C, Xu W Z. The decrease of continuous cropping soybean and the change of soil environment [J]. Soybean Science, 1995, 14(4): 321-328.)
- [14] 许艳丽, 陈伊里, 司兆胜, 等. 不同茬口条件下的作物根渗出物对大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines*) 卵孵化影响 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(6): 481-486. (The effects of the root diffusate of different rotation systems on the egg hatch of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2004, 34(6): 481-486.)
- [15] 司兆胜, 许艳丽, 李兆林, 等. 不同茬口种植的大豆品种根渗出物对大豆胞囊线虫卵孵化的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(3): 62-66. (Si Z S, Xu Y L, Li Z L, et al. Hatch of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* egg in root diffusate from resistant and susceptible soybean cultivars on different rotation systems [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(3): 62-66.)

(上接第 253 页)