

不同耐性大豆品种阿特拉津处理后的防御酶反应

沈红秋, 段玉玺, 陈立杰, 朱晓峰, 王媛媛, 黄姗姗

(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:为阐明大豆对除草剂阿特拉津的耐性机制,利用 250 mg · L⁻¹ (田间使用浓度)阿特拉津处理大豆,在处理不同时间分别测定大豆根系与叶片中过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶活性的变化。结果表明:大豆在接受阿特拉津处理后,3 种酶的活性高于未经过阿特拉津处理的大豆。阿特拉津处理后大豆根系的酶活明显高于叶片的活性,而且大豆根系的酶活力变化要早于叶片酶活力的变化。耐性品种 3 种酶活性远高于敏感性品种。

关键词:大豆;阿特拉津;过氧化物酶(POD);多酚氧化酶(PPO);苯丙氨酸解氨酶(PAL)

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)02-0259-04

Defense Enzymatic Reaction of Different Tolerant Soybean Varieties after Treated with Atrazine

SHEN Hong-qiu, DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie, ZHU Xiao-feng, WANG Yuan-yuan, HUANG Shan-shan

(Nematology Institute of Northern China, Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

Abstract: Maize and soybean rotation is very common in north of China. However, the heavy residue of Atrazine, the major corn herbicide is harmful to soybean growth. In order to screen some tolerant varieties and research the mechanism, treated soybean with 250 mg · L⁻¹ Atrazine and determined the activities of peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO), phenylalanine ammonialyase (PAL) in soybean plants roots and leaves after 0, 24, 48, 72 and 96 h. The results showed that POD, PPO and PAL in treated soybean were higher than control and the activities of enzymes in roots reacted early and higher than those in leaves. The enzyme activities of tolerant varieties were higher than sensitive varieties.

Key words: Soybean; Atrazine; POD; PPO; PAL

玉米主要除草剂阿特拉津在土壤中的逐年残留对大豆产生很深的毒害,影响其正常生长,由于植物自身的耐性差异,阿特拉津的长期使用使某些耐性大豆品种体内逐渐形成了一套保护机制^[1]。在组织结构、生理生化上产生一系列反应,其中参与各种代谢酶活性变化最活跃,这些变化与植物的抗性密切相关。该试验通过对实验室现有的 400 余份大豆品种进行筛选,获得对阿特拉津有较强耐性的 2 个品种,研究过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶的活性变化规律,为筛选耐阿特拉津大豆种质提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种 绥农 26 为阿特拉津耐性品种,由黑龙江省农业科学院绥化分院提供;沧豆 9 号为中等耐性品种,由沧州市农林科学院提供;九三 03-

42 为敏感性品种,由黑龙江省农垦总局九三科学研究所提供。以上品种均保存于沈阳农业大学植物保护学院北方线虫研究所。

1.1.2 阿特拉津 吉林金秋农药有限公司生产,有效成分含量为 38%,剂型为悬浮剂。

1.2 试验设计

经过长期筛选找出对阿特拉津耐性较强、中等耐性以及敏感的大豆品种,对其用同一浓度的阿特拉津处理。阿特拉津浓度的选择是根据植物在受 500 mg · L⁻¹ 除草剂侵害时^[2],植物酶活性最高。在此浓度基础上向上延伸至 2 000 和 1 000 mg · L⁻¹ 2 个浓度,向下延伸至 250 和 50 mg · L⁻¹ 2 个浓度,研究阿特拉津对大豆影响的变化情况,最终确定适宜的处理浓度为 250 mg · L⁻¹。另外,通过叶片和根系来对比大豆不同部位对阿特拉津侵害的反应。

大豆采用盆栽种植,塑料钵上口直径 30 cm、盆底直径 20 cm、高 25 cm。每盆装土至 17 cm 高。每

收稿日期:2010-12-19

基金项目:国家现代农业产业技术体系资助项目;农业部公益性行业科技专项资助项目(20090340-03)。

第一作者简介:沈红秋(1984-),女,在读硕士,研究方向为有害生物与环境安全。E-mail:hongqiu20023@yahoo.com。

通讯作者:段玉玺(1964-),男,教授,博士生导师,主要从事植物病理学和植物线虫学方面的研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

盆种植相同品种的大豆4株,当大豆生长到5~8片叶时,在尽量不损伤根系的情况下,将大豆从盆土中取出,将根系用无菌水冲洗干净后,放到Hoagland植物营养液中,溶液中通入氧气进行水培,每天更换新的Hoagland营养液。在4d后有新的根系长出时,将阿特拉津注入Hoagland营养液中,最后调节浓度为 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每天更换含有阿特拉津的Hoagland营养液。水培的目的是防止土壤中的菌类对阿特拉津有降解作用。而且根系均匀接触,不会出现由于喷施不均匀而对试验结果造成误差。以不加阿特拉津处理为对照。在阿特拉津处理后第0、24、48、72、96 h采集叶片和根系,用液氮处理后,放入 -80°C 冰箱保存待用。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 酶粗提液的提取 参照薛应龙的方法^[3],准确称取1.0 g叶片和1.0 g的根,放入预冷的研钵中,加入1.0 mL硼酸缓冲液($0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.8的硼酸缓冲液含 $1\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇)冰浴充分研磨后,转移至预冷的离心管中,用1.5 mL上述缓冲液冲洗2次,合并倒入5 mL离心管中。 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C 离心20 min,上清液即为酶液的粗提取液。将酶粗提液迅速倒出,放入 -20°C 冰箱中保存待用。

1.3.2 过氧化物酶(POD)活性的测定 参照张志良的方法^[4]有所改进,愈创木酚溶液 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5.8,磷酸缓冲液含 $0.018\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 愈创木酚。称取 $1.4325\text{ g NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $7.1764\text{ g Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$,用蒸馏水溶解,再加 0.55863 g 愈创木酚,混合,用蒸馏水定容到500 mL。取 $10\ \mu\text{L}$ 酶粗提液,与3 mL愈创木酚溶液混合。 30°C 平衡1 min后,加 $50\ \mu\text{L}$ 双氧水溶液起始反应,记录470 nm处的光密度值3 min(3 min后的吸光值不超过1个吸收单位,则酶反应初始速度与加入的酶液量为线性关系),以加相同体积的提取磷酸缓冲液为空白对照。3次重复。pH7.0, 25°C 最佳,约4 h后测定。

1.3.3 多酚氧化酶(PPO)活性的测定 参照许艳丽的方法^[5],有所改进。pH6.8的 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚溶液:称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.510 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.591 g加入 0.44044 g 邻苯二酚,定容至200 mL。取3 mL $0.1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ pH6.8的含 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚的磷酸缓冲液,加入 $40\ \mu\text{L}$ 酶液,混合均匀,于 30°C 水浴中反应2 min,测量398 nm波长下吸光值的变化,以不加酶液而加相同体积提取液的磷酸缓冲液为空白对照,以每分钟 OD_{398} 值变化0.01为1个酶活力单位,计算酶比活力。

1.3.4 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定 参照Wang等^[6]的方法有所改进,取2支试管,一支加入 $0.6\text{ mL } 0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.8 硼酸缓冲液, 0.1 mL 水,另一支加入 $40\ \mu\text{L } 0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.8 提取缓冲液代替酶液,其它相同,混均,在 40°C 水浴中反应15 min后,于冰浴中终止反应,在290 nm处,以不加酶的为空白对照测吸光值,重复测量3次,取平均值。在上述条件下,每小时OD值变化0.01的酶量定为1个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津处理后 POD 酶活性变化

2.1.1 根系 POD 酶活性变化 如图1A所示,在阿特拉津处理后,第24和48 h大豆品种与其对照之间没有显著的活力增减变化。在阿特拉津处理后第72 h,3个不同耐性品种到达酶活高值。绥农26的POD活性是阿特拉津处理前的42.867倍,是敏感品种九三03-42的5.103倍,是中等耐性品种沧豆9号的1.604倍。达到峰值时,2个耐性品种绥农26和沧豆9号酶活达到峰值时远高于各自对照POD酶活力水平。而敏感品种九三03-42略高于对照。

2.1.2 叶片 POD 酶活性变化 如图1B所示,叶片中POD酶活力要远低于根系中POD酶活力。根系中酶活力的高峰值($1\ 340.868\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)是叶片中高峰值($64.49102\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)的20.647倍。叶片中POD最高酶活性是其对照的1.6817倍,而植株根系中,最高POD酶活力是其对照的10.1743倍。也就是说叶片受到阿特拉津侵害后酶活力变化小。在叶片中3个不同耐性品种的POD酶活性在48 h达到最高峰,耐性品种绥农POD酶活力是对照的1.6817倍,敏感品种九三03-42略低于对照。

2.2 阿特拉津处理后 PPO 酶活性变化

2.2.1 根系 PPO 酶活性变化 在根系中,耐性品种绥农26和敏感品种九三03-42的PPO活力随着时间的延长而逐渐增大,中等耐性品种沧豆9号在72 h达到了PPO活力峰值,如图2A,耐性品种绥农26和敏感性品种九三03-42在96 h时达到峰值。3个品种达到PPO酶活力峰值分别是阿特拉津处理前的40.36、16.74和13.71倍。这说明阿特拉津处理后耐性品种绥农26 PPO酶活力的变化幅度最大。

2.2.2 叶片 PPO 酶活性变化 叶片中PPO酶活力要低于根系中PPO酶活力。如图2B,在根系中酶活力的峰值($0.013\ 223\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)是叶片中峰值

($0.007\ 729\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}\ \text{FW}$) 的 1.711 倍。说明根系中酶活力高于叶片中酶活力。耐受品种绥农 26 和敏感品种九三 03-42 PPO 活力随着时间的延长逐渐增

大。中等耐受品种沧豆 9 号,酶活力出现曲折性变化。但是 3 个品种都是在处理后第 96 h 出现酶活高峰,而且酶活数值相近。

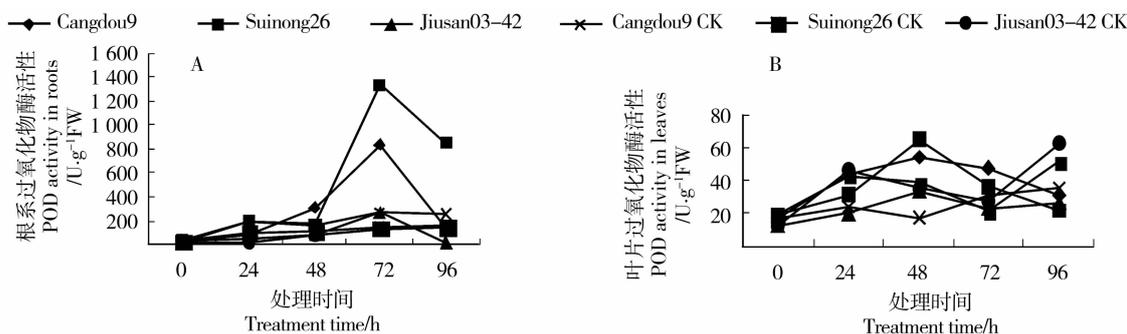


图 1 不同耐受性大豆品种阿特拉津处理后根系 (A) 和叶片 (B) 中过氧化物酶活变化

Fig. 1 Changes of POD activity in different tolerant soybeans after atrazine treatment in roots (A) and leaves (B)

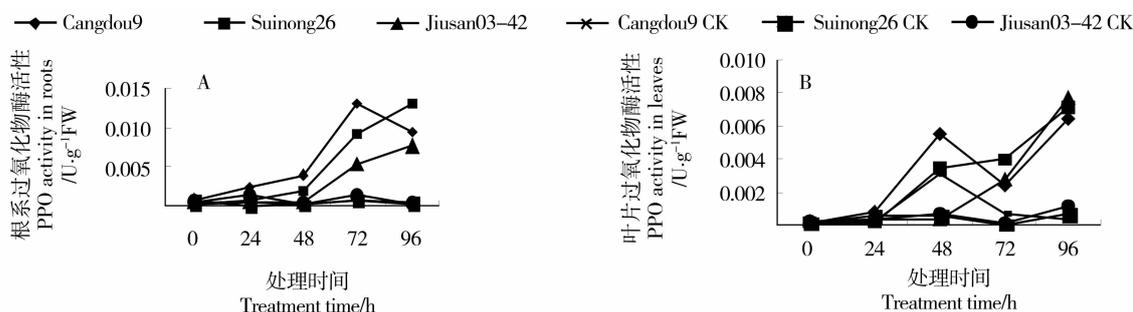


图 2 不同耐受性大豆品种阿特拉津处理后根系 (A) 和叶片 (B) 多酚氧化酶活变化

Fig. 2 Changes of PPO activity in different tolerant soybeans after atrazine treatment in roots (A) and leaves (B)

2.3 阿特拉津处理后 PAL 酶活性变化

2.3.1 根系 PAL 酶活性变化 如图 3A 所示,中等耐受品种沧豆 9 号和敏感品种九三 03-42 在阿特拉津处理 24 h 后都出现峰值,中等耐受品种沧豆 9 号 PAL 酶活力达到最高后活性开始下降,但是酶活性仍然高于敏感品种。而耐受品种绥农 26 随着时间增加活性逐渐增高,在 48 h 酶活性开始高于中等耐受品种和敏感品种,耐受品种峰值是敏感品种峰值

的 4.938 倍。

2.3.2 叶片 PAL 酶活性变化 如图 3B 所示,敏感品种在第 48 h 出现 PAL 酶活高峰,是 48 h 对照的 1.574 倍。2 个耐受品种在第 72 h 出现酶活高峰;耐受品种绥农 26 是其对照的 19.156 倍;中等耐受品种沧豆 9 号是对照酶活性的 1.9156 倍;叶片 PAL 酶活力低于根系中 PAL 的活力,相差 10 倍左右。

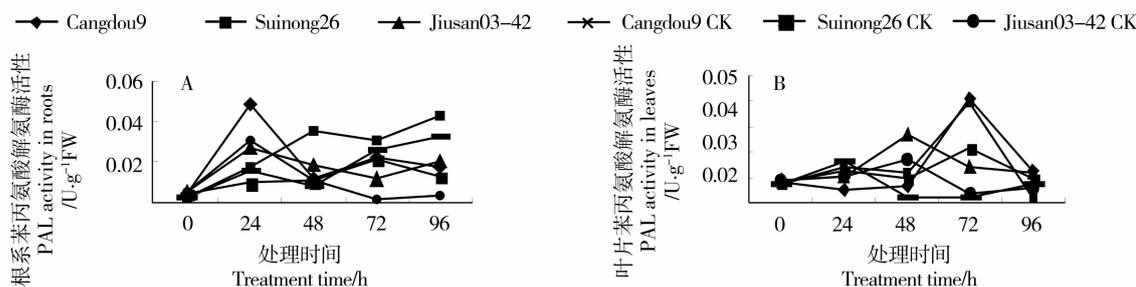


图 3 不同耐受性大豆品种阿特拉津处理后根系 (A) 和叶片 (B) 苯丙氨酸解氨酶活变化

Fig. 3 Changes of PAL activity in different tolerant soybeans after atrazine treatment in roots (A) and leaves (B)

3 结论与讨论

过氧化物酶广泛存在于植物中,是活性较高的一种酶。它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系,它参与木质素合成的最后一步,是木质素合成的一个关键酶^[7]。同时过氧化物酶是测试植物根系活力的一个重要参数。相见松中等认为 α -萘胺氧化的本质就是过氧化物酶的催化作用,该酶的活力愈强,根系活性越大。植物经过阿特拉津处理后,POD酶活力与对照相比明显提高。阿特拉津处理后,大豆根系POD酶活性是叶片酶活力的20.647倍。说明大豆根系受到阿特拉津的伤害远高于叶片受到的伤害。根系在受到除草剂阿特拉津药害后,POD酶活性升高,是因为植物体内大量合成木质素以保护植物免受阿特拉津的侵害。

多酚氧化酶能进行去甲基化反应,这对于木质降解是相当重要的,而且PPO在IAA控制的一些过程中也可能起作用。产生的复合物能提高植物切割部分的生根能力^[8]。根系中的PPO酶活性同样表现出耐性品种酶活高,中等耐性先出现峰值而后降低的趋势,敏感性品种酶活较弱的特征,多酚氧化酶可以帮助大豆调节生长素IAA的含量,促进根系生长,减轻阿特拉津的伤害。

苯丙烷类代谢是次级代谢途径中很重要的一步,在苯丙氨酸解氨酶作用下,苯丙烷类代谢完成第一步反应,生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物,这些化合物进一步转化为香豆素、绿原酸,也可以形成苯丙烷酸CoA酯,再进一步代谢转化为一系列苯丙素类化合物,如黄酮体、木质素、生物碱,这些次生产物对植物生长发育、抵御病虫害、防紫外线及构成植物支撑系统等方面具有重要意义,苯丙氨酸解氨酶是植物次生代谢,特别是苯丙烷途径的关键酶和限速酶^[9]。在根系中,耐性品种PAL的含量第24h就达到了高峰,要比其它2种酶达到高峰的时间早,这说明PAL是木质素中合成步骤中的关键酶。

该研究表明,POD、PPO和PAL在根系中的酶活力要远远高于叶片中的酶活力,说明在大豆受到阿特拉津药害时,根系中防御药害的能力直接发挥重要的作用。耐性品种3种酶活力出现的峰值晚,酶活性高,这有利于耐性物质的积累和贮藏,达到耐药害的目的。而敏感性品种酶活性低,所以耐性差。研究大豆品种耐阿特拉津的机制可以为筛选

耐除草剂品种提供一定的理论依据^[10]。

参考文献

- [1] 孙红炜,路兴波,杨崇良.不同抗性品种玉米接种甘蔗花叶病毒(SCMV)后4种防御酶活性变化研究[J].植物病理学报,2006,36(2):181-184.(Sun H W, Lu X B, Yang C L. Changes in activities of four defense enzyme in different resistant maize cultivars infected with sugarcane mosaic virus (SCMV) [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(2): 181-184.)
- [2] 高宗军.甲基二磺隆敏感与耐性小麦细胞色素P450对比研究[D].北京:中国农业大学,2005:13-14.(Gao Z J. Comparative study on cytochrome P450 from mesosulfuron-sensitive and mesosulfuron-tolerant wheat cultivars [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005:13-14.)
- [3] 薛应龙.植物生理学实验[M].北京:高等教育出版,1990.(Xue Y L. Plant physiology experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990.)
- [4] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2005:121-123.(Zhang Z L. The guidance of plant physiology experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 121-123.)
- [5] 许艳丽,司兆胜,李春杰,等.大豆不同抗性品种感染胞囊线虫后防御酶活性变化[J].农业系统科学与综合研究,2009,25(4):453-457.(Xu Y L, Si Z S, Li C J, et al. Activities of defense enzymes after different resistant soybean varieties inoculated with SCN[J]. System Sciences Comprehensive Studies in Agriculture, 2009, 25(4): 453-457.)
- [6] Wang H Z, Liu G H, Zheng Y B. Breeding of *Brassica napus* cultivar Zhongshuang 9 with high-resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* and dynamics of Its important defense enzyme activity[J]. Agricultural Sciences in China, 2003, 11(2): 1192-1197.
- [7] 梁艳荣,胡晓红,张颖力,等.植物过氧化物酶生理功能研究进展[J].内蒙古农业大学学报,2003,24(2):110-113.(Liang Y R, Hu X L, Zhang Y L, et al. Progress on physiological function research of plant peroxidase[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University, 2003, 24(2): 110-113.)
- [8] 谢春艳,宾金华,陈兆平,等.多酚氧化酶及其生理功能[J].生物学通报,1999,34(6):11-13.(Xie C Y, Bing J H, Chen Z P, et al. Polyphenoloxidase and physiological functions [J]. Bulletin of Biology, 1999, 34(6): 11-13.)
- [9] 马俊彦,杨汝德,敖利刚.植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展[J].现代食品科技,2007,23(7):71-74.(Ma J Y, Yang N D, Ao L G. Progress in biological research of phenylalanine ammonialyase (E. C. 4. 3. 1. 5) [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(7):71-74.)
- [10] 刘明宗.除草剂抗性的发展:抗性杂草抗性和抗性作物[J].杂草科学,2002,23(1):53-64.(Liu M Z. Development of herbicide resistance: Herbicide resistant weeds and herbicide resistant crops [J]. Weed Science, 2002, 23(1):53-64.)