

臭氧胁迫对大豆根系激素含量和活性氧代谢的影响

赵天宏,刘 波,王 岩,赵艺欣,刘轶鸥,郭 伟
(沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 以大豆 (*Glycine max.*) 为试验材料,探讨臭氧(O_3)浓度升高 $[(80 \pm 10) \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}]$ 对大豆根系内源激素含量及活性氧代谢系统的影响。研究表明:在大豆整个生育期内, O_3 胁迫处理下的大豆根系脱落酸(ABA)含量、玉米素核苷(ZR)含量与对照相比显著($P < 0.05$)升高,生长素(IAA)含量显著($P < 0.05$)降低,内源激素间平衡改变,IAA/ABA、AR/ABA 及 (IAA + ZR)/ABA 比值显著($P < 0.05$)降低,超氧阴离子产生速率、MDA 含量、POD 活性和脯氨酸含量与对照相比显著($P < 0.05$)升高,SOD 和 CAT 活性显著($P < 0.05$)降低。 O_3 胁迫在一定程度上可以改变内源激素的含量及激素间的平衡比例,提高大豆的抗氧化能力,但是,长时间的胁迫作用将导致抗氧化系统氧化损伤,从而使膜脂过氧化程度加重,对大豆表现为伤害效应。

关键词: 大豆;臭氧胁迫;内源激素;活性氧;抗氧化能力
中图分类号: S565.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7601(2013)04-0119-05

Effects of ozone stress on soybean roots endogenous hormones
and reactive oxygen metabolism

ZHAO Tian-hong, LIU Bo, WANG Yan, ZHAO Yi-xin, Liu Yi-ou, GUO Wei
(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

Abstract: The effects of O_3 concentration elevation $[(80 \pm 10) \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}]$ on soybean roots endogenous hormones and reactive oxygen metabolism was studied in this paper. Compared with the control, the elevated O_3 concentration induced an increase of abscisic acid (ABA) content and Zeatin riboside (ZR) content ($P < 0.05$), and a decrease of growth hormone (IAA) content ($P < 0.05$). The balance of endogenous hormones was changed, and the specific value of IAA/ABA, AR/ABA and (IAA + ZR)/ABA was decreased ($P < 0.05$). The production rate of superoxide anion, the malondialdehyde (MDA) content POD activity and the proline content were increased ($P < 0.05$) and the SOD and CAT activity were decreased ($P < 0.05$). To a certain extent, ozone stress changed the soybean endogenous hormones level and balance and improved its antioxidant ability. However, constant ozone stress could cause the anti-oxidant system damage, exacerbate the membrane lipid peroxidation, and injure the soybean.

Keywords: soybean (*Glycine max.*); Ozone stress; plant endogenous hormones; reactive oxygen species; antioxidant ability

臭氧(O_3)是主要的二次空气污染物,对动、植物和人类健康都有不利影响。对流层清洁大气中 O_3 的自然背景浓度为 $40 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,在污染大气中的瞬时浓度可达 $100 \sim 200 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ [1]。预计到 2100 年,全球有森林覆盖的地表中约有 50% 其对流层 O_3 浓度将超过 $60 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ [2]。从微观结构、生理生化功能到生长发育以及生态系统等各个层次上, O_3 都能对植物产生影响。因此,研究未来近地面 O_3 浓度增加对植物的影响,已成为国内外学者关注的焦

点 [3-4]。利用酶联免疫法或者液相色谱法测定植物内源激素含量 [5-6] 发现,胁迫处理可明显降低黑麦和小麦 [7]、玉米 [8] 等叶片、蕃茄根部 [9] 中生长素(IAA)含量,脱落酸(ABA)的含量升高 [10-11],蕃茄中玉米素(ZR)含量变化因季节而异,呈升高或降低趋势 [12]。胁迫处理改变了内源激素物质之间的平衡,凤梨中 IAA/ABA, GA3/ABA 和 ZR/ABA 比值降低 [13-14],打破了植物体内原有激素之间的平衡。目前,关于臭氧浓度胁迫对大豆根部激素物质所起

收稿日期:2012-08-23
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30970448);辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LJQ2011072)
作者简介:赵天宏(1972—),男,辽宁义县人,教授,博士生导师,主要从事植物生理生态研究。E-mail:zh1999@163.com。
通信作者:王 岩(1971—),女,辽宁沈阳人,助研,硕士,主要从事农业生态学研究。E-mail:wy0000@126.com。

到的作用和机理尚不清楚。本试验利用开顶式气室,研究臭氧浓度升高对大豆根系激素含量及脂质过氧化的影响,旨在揭示激素对臭氧浓度升高的适应机制与响应方式,为从分子水平研究植物内源激素对臭氧浓度增加的适应机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验以大豆 (*Glycine max.*) 栽培品种“铁丰 29”为试验材料。该品种以铁 8114-7-4 为母本与铁 84059-13-8 杂交选育而成,生育期为 130~133 d,适合中等以上肥力土壤种植。

1.2 试验设计

试验在中国科学院沈阳野外农田生态系统生态站进行,利用开顶式气室 (OTC) 对大豆进行熏蒸试验。主要设备为 6 个结构完全相同的 OTCs (横截面为正八边形,边长 1.15 m,高 2.4 m,玻璃室壁) 及其配套的通气、通风控制设备。主要包括臭氧发生器 (BGY-Q8, 北理国科, 中国) 和监控 O_3 浓度的臭氧传感器 (S-900, 艾尔科, 新西兰) 等数据分析与自动控制充气系统。在整个试验期间,气室内实际气体浓度控制稳定。

试验设 2 个处理: CK (对照, 自然空气中 O_3 浓度, 约为 $45 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 O_3 (O_3 浓度升高, $(80 \pm 10) \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$)。采用直播试验, 2011 年 4 月 30 日播于气室内, 每个气室大约 120 株 (相当于 $18 \text{ 万株} \cdot \text{hm}^{-2}$)。于大豆分枝期前 (6 月 10 日) 开始通入 O_3 , 每天熏蒸 8 h (9:00—17:00)。试验期间水分、肥料均匀一致, 无病虫害及杂草等限制因素。分别于大豆分枝期 (6 月 30 日)、开花期 (7 月 24 日) 和结荚期 (8 月 12 日) 取样, 每次选取各处理大豆相同部位的根系充分混合后, 进行相关生理指标的测定, 每个处理气室内重复 3 次。8 月 30 日停止通气直至成熟收获 (9 月 24 日)。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 激素含量的测定 内源激素 IAA、ABA 和 ZR 含量: 高效液相色谱法测定^[15]。高效液相色谱仪 (1100LC, 美国 Agilent 公司), 检测器为二极管阵列检测器 (DAD)。激素标样 IAA、ABA、ZR 为 Sigma 公司产品。大豆根系 1 g, 加 8 倍量 80% 甲醇 (预冷) 浸泡, 人工剪碎, 机械匀浆 4°C 过夜, 离心 10 min (4°C , $18\,800 \text{ g}$), 离心后残渣加入少许甲醇 (体积比 1:5) 重复提取 2 次, 离心 10 min (4°C , $18\,800 \text{ g}$)。合并上清液, 再次离心 10 min, 取其上清液过 C18 小柱; 加入 1 mL pH3.0 磷酸缓冲液溶解, 乙酸乙酯等

体积萃取 3 次, 上层 (乙酸乙酯) 相真空干燥浓缩, 2 mL 甲醇溶解, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 有机系微孔滤膜, 所得样品在 HPLC 上测定 IAA、ZR、ABA 含量并计算相对含量。

1.3.2 生理指标测定 脯氨酸含量: 采用磺基水杨酸法测定^[16]。

活性氧代谢系统: 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 采用 NBT 光还原法测定^[16]; 过氧化氢酶 (CAT) 活性, 采用紫外吸收法, 以每分钟 OD_{240} 减少 0.01 为一个酶活力单位^[16]; 过氧化物酶 (POD) 活性, 采用紫外吸收法^[16]; 丙二醛 (MDA) 含量测定, 采用硫代巴比妥酸法测定^[16]; 超氧阴离子自由基产生速率, 采用羟胺法测定^[16]。

1.4 数据处理

采用 DPS2.0 数据处理系统和 Microsoft Excel 2010 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 O_3 胁迫对大豆根系 ABA、ZR 和 IAA 含量的影响

O_3 胁迫下大豆根系 ABA、ZR 和 IAA 含量及相对含量变化见图 1 所示, 随着大豆生育时期的推进, 大豆根系中 ABA 含量呈现上升趋势, 并且两个处理表现为 O_3 胁迫 > CK, 与对照相比, 臭氧胁迫下大豆根系中 ABA 含量的增幅为 14.8%~33.6%, 并且 ABA 含量的增幅随着胁迫时间延长而降低, 即分枝期 > 开花期 > 结荚期。说明在一定强度的 O_3 胁迫下, 大豆根系中 ABA 含量增加, 但随着胁迫时间的延长, 大豆对臭氧具有一定的抵抗能力。

与对照相比, O_3 处理下大豆根系中 ZR 含量的增幅为 13.6%~21.6%, 并且 ZR 含量的增幅随胁迫时间延长而下降, 说明在一定强度的 O_3 胁迫下, 大豆根系中 ZR 含量增加, 随着熏蒸时间的延长, 大豆对胁迫逐渐适应, 影响趋于平缓。

大豆根系中 IAA 含量呈现下降趋势, 与对照相比, O_3 处理下大豆根系中 IAA 含量的降幅为 25.0%~35.0%, 并且 IAA 含量的降幅是随着胁迫时间的延长而增大, 说明在高浓度 O_3 下根系 IAA 含量降低。

2.2 O_3 胁迫对大豆根系内源激素平衡的影响

从图 2 可知, 随着大豆生育期的推进, 大豆根系中 IAA/ABA、ZR/ABA 和 (IAA + ZR)/ABA 值均呈现下降趋势。与对照相比, O_3 处理下大豆根系中 IAA/ABA 值的降幅为 40.3%~48.5%, ZR/ABA 相对含量的降幅为 1.0%~9.1%, (IAA + ZR)/ABA 相对含量的降幅为 34.0%~43.0%。说明臭氧胁迫

下,大豆根系激素平衡由促进生长作用向促进植物衰老作用发展,并且在激素相互作用中,ZR 所占比

例较低,作用有限。

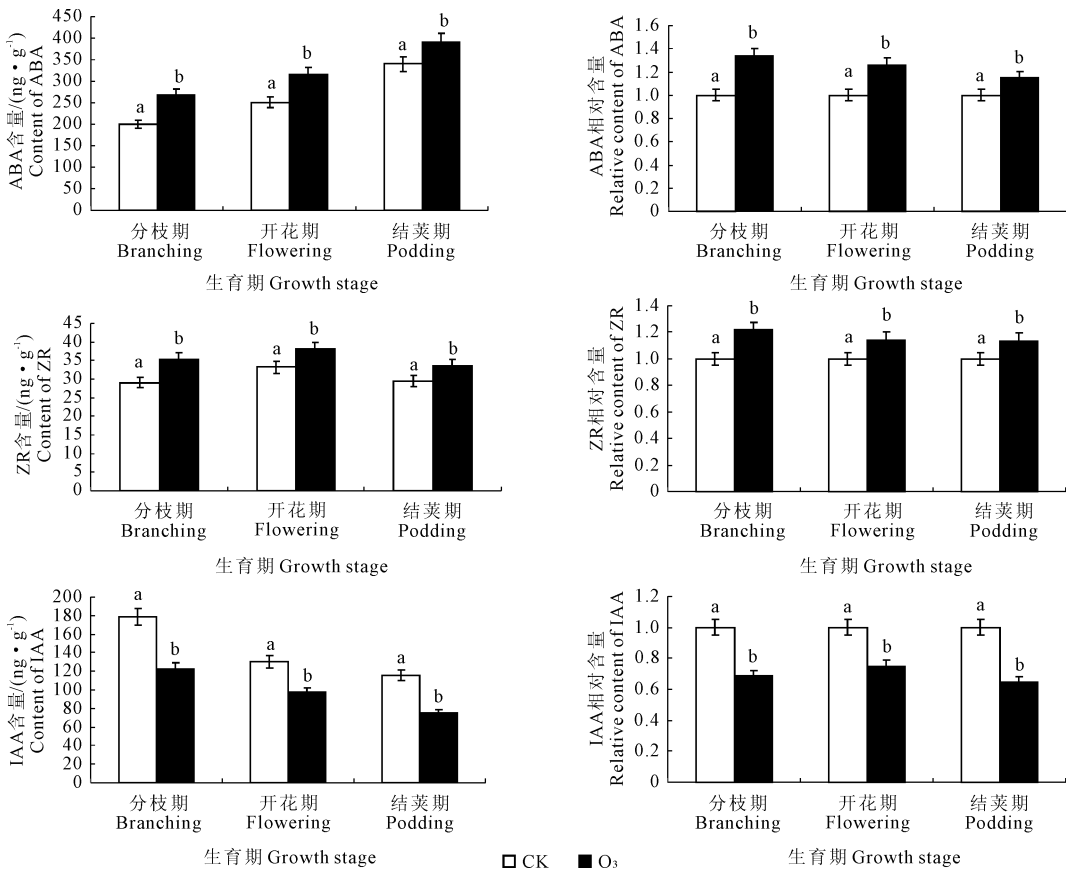


图 1 O₃ 胁迫下大豆根系 ABA、ZR 和 IAA 含量的变化

Fig.1 The changes of ABA、ZR and IAA content in soybean root under O₃ stress

注:图中同一时期小柱上不同字母表示处理之间差异显著(P<0.05),相同字母表示处理之间差异不显著(P>0.05),下同。激素相对含量 = 处理条件下激素含量/对照条件下激素含量

Note: Different small letters in the rows show the significance of different treatment at P<0.05 level. The same as follows. Releative content of hormones = Hormone content of treatment/Hormone content of control

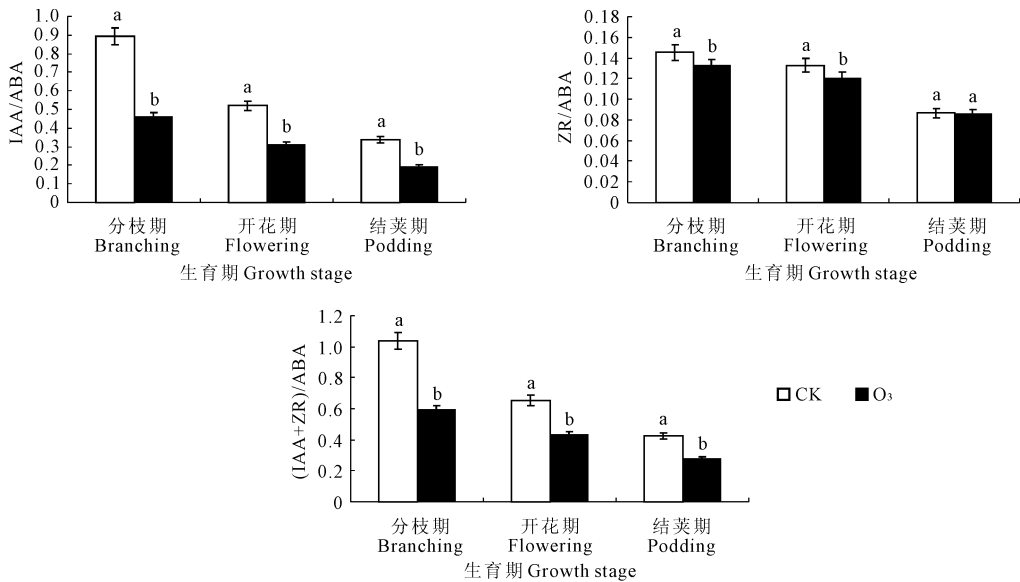


图 2 O₃ 胁迫下大豆根系 IAA/ABA、ZR/ABA 和 (IAA + ZR)/ABA 相对含量的变化

Fig.2 The changes of IAA/ABA、ZR/ABA and (IAA + ZR)/ABA relative content in soybean root under O₃ stress

2.3 O₃ 胁迫对大豆根系活性氧代谢的影响

从图 3 可知,随着大豆生育时期的推进,大豆根系中超氧阴离子产生速率呈现上升趋势,与对照相比,O₃ 处理下大豆根系中超氧阴离子产生速率的增幅为 7.4% ~ 12.5%,在结荚期存在显著差异($P < 0.05$)。大豆根系中 MDA 含量呈现上升趋势,与对照相比 O₃ 处理下大豆根系中 MDA 含量的增幅为 6.5% ~ 38.7%,并且在结荚期达到显著差异($P < 0.05$)。说明高浓度 O₃ 胁迫促使大豆根系超氧阴离子产生速率增大,MDA 含量升高。

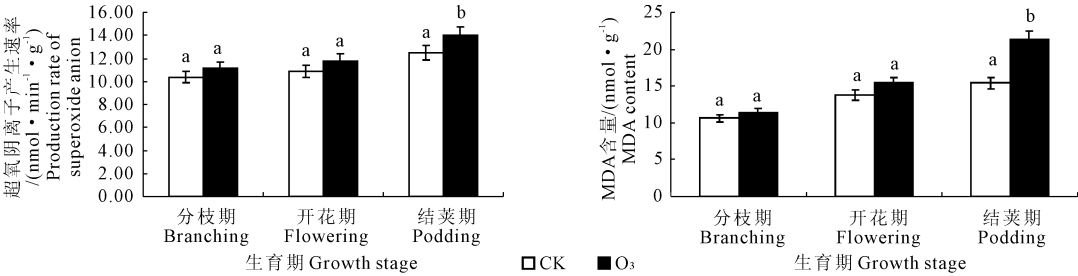


图 3 O₃ 胁迫下大豆根系超氧阴离子产生速率和 MDA 含量的变化

Fig.3 The changes of production rate of superoxide anion and MDA content in soybean root under O₃ stress

从图 4 可知,随着 O₃ 胁迫时间的延长,大豆根系中 SOD 活性和 CAT 活性均呈现下降趋势,与对照相比,O₃ 处理下大豆根系中 SOD 活性的降幅为 8.2% ~ 21.9%,CAT 活性的降幅为 4.6% ~ 21.1%。而 POD

活性表现为升高趋势,但处理间表现为 CK > O₃ 胁迫,POD 活性的降幅为 17.7% ~ 33.3%,在开花期和结荚期均达到显著差异($P < 0.05$)。说明一定浓度的 O₃ 胁迫使大豆根系中主要保护酶活性降低。

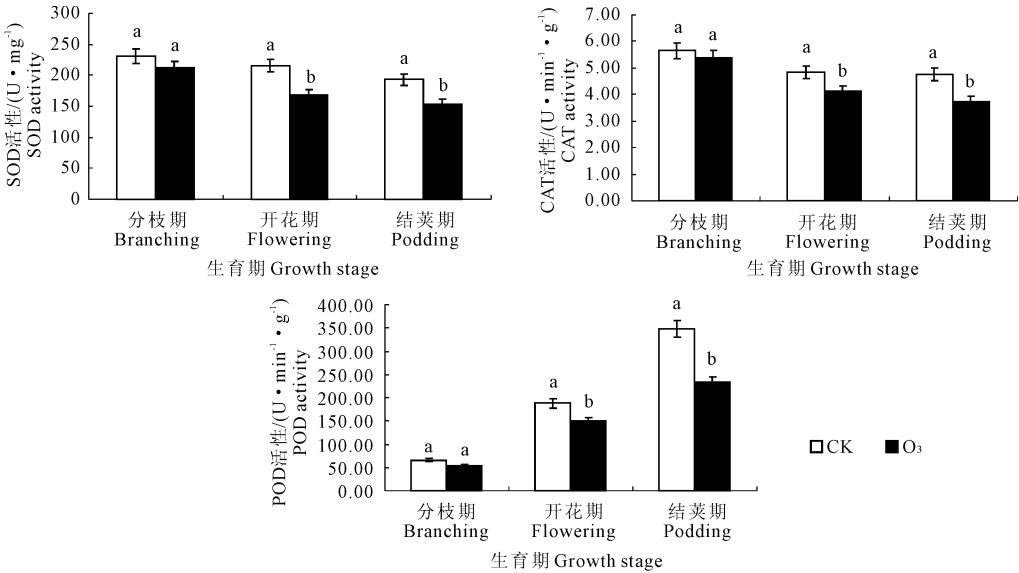


图 4 O₃ 胁迫下大豆根系 SOD、CAT 和 POD 活性的变化

Fig.4 The Changes of SOD、CAT and POD activity in soybean root under O₃ stress

从图 5 可知,随着大豆生育期的推进,大豆根系中脯氨酸含量呈现上升趋势。与对照相比,O₃ 处理下大豆根系中脯氨酸含量的增加幅度为 22.1% ~ 43.8%,并且在开花期和结荚期达到显著差异($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

内源 ABA 是植物响应外界胁迫的主要信号分子,其含量上升是植物抵抗逆境的一种生理反应。

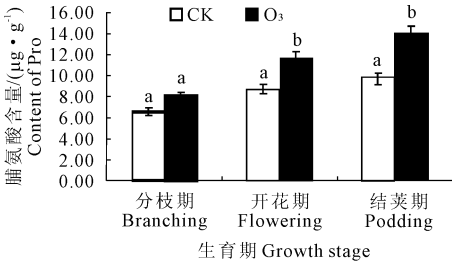


图 5 O₃ 胁迫下大豆根系脯氨酸含量的变化

Fig.5 The changes of pro content in soybean root under O₃ stress

本试验结果表明, O_3 胁迫下大豆根系超氧阴离子产生速率和丙二醛含量上升, 膜脂过氧化加剧, 诱导 ABA 含量增加。说明 O_3 胁迫下植物启动 ABA 合成系统促进 ABA 积累, 并通过 ABA 信号转导对胁迫做出积极的、主动的适应性反应, 调节 SOD、CAT 和 POD 等保护酶活性, 促使自由基在产生和清除之间维持一种动态平衡, 增强植物抗性。同时 ABA 诱导与胁迫相关的基因表达, 影响渗透调节物质合成, 本试验表明 ABA 可以促进脯氨酸合成, 增强植株抵抗逆境的能力, 类似结论在林文雄^[17]和江铃^[18-19]所做的水稻试验中亦得到证实。

IAA 能够加速细胞分裂, 促进叶片扩大和茎伸长。本试验中当大豆植株受到臭氧胁迫时, 根部 IAA 含量降低, 使 IAA 的运输受到限制, 以适应植物在逆境环境下的生长。ZR 是大豆等高等植物体内主要的细胞分裂素, 其含量提高可直接或间接地清除活性氧, 减少膜脂过氧化作用。本研究结果表明, 臭氧胁迫下大豆根系 ZR 含量增加, 有利于增强大豆的抗氧化能力。不同种类的植物受到胁迫作用时, 植株体内的 ZR 含量变化不同, 干旱胁迫使棉花体内 ZR 含量极显著升高, 而镉胁迫烟草的根部, ZR 含量迅速减少^[21]。此外, 植物内源激素物质之间存在相互作用, 本试验中 IAA/ABA、ZR/ABA 和 (IAA + ZR)/ABA 比值降低, 打破了植株内原有的激素之间的种类含量平衡, 影响植株在胁迫条件下的代谢水平, 这与杨梅树试验中表现一致^[22]。

综上所述, 臭氧浓度升高可以影响内源激素物质含量的变化以及内源激素之间的平衡比例, 改变大豆根部系统内源激素物质的整体水平, 进而影响大豆根系代谢水平, 胁迫初期能够提高大豆根系的抗氧化能力, 但是长时间的臭氧胁迫导致大豆根系氧化损伤, 膜脂过氧化加重, 对大豆根系表现为伤害效应。

参考文献:

- [1] Fishman J. The global consequences of increasing tropospheric ozone concentrations[J]. *Chemosphere*, 1991, 22(7):685-695.
- [2] Felzer B, Kicklighter D, Mellilo J, et al. Effects of ozone on net primary production and carbon sequestration in the conterminous United States using a biogeochemistry model[J]. *Tellus*, 2004, 56B:230-248.
- [3] Gaucher C, Costanzo N, Widden P, et al. Response to an ozone gradient of growth and enzymes implicated in tolerance to oxidative stress in *Acer saccharum* (Marsh.) seedlings[J]. *Annals of Forest Science*, 2006, 63(4):387-397.
- [4] Morgan P B, Mies T A, Bollero G A, et al. Season-long elevation of ozone concentration to projected 2050 levels under fully open-air conditions substantially decreases the growth and production of soybean[J]. *New Phytologist*, 2006, 170(2):333-343.
- [5] 张静, 王进, 田丽萍. 臭氧浓度增强对植物生长的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2006, 25(22):104-108.
- [6] Shahinul S M, Narendra T. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species[J]. *Plant Science*, 2012, 182:134-144.
- [7] Zhang H, Tan G L, Yang L N, et al. Hormones in the grains and roots in relation to post-anthesis development of inferior and superior spikelets in japonica/indica hybrid rice[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47:195-204.
- [8] He H Y, He L F, Gu M H, et al. Nitric oxide improves aluminum tolerance by regulating hormonal equilibrium in the root apices of rye and wheat[J]. *Plant Science*, 2012, 183:123-130.
- [9] Sally W, Mark A B, William J D. Nitrate signaling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58:1705-1716.
- [10] Stella L, Antonio S, Michele P, et al. Absciscic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169:226-233.
- [11] Ewa P, Agnieszka P, Franciszek J, et al. ABA level, proline and phenolic concentration, and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*)[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2009, 73:126-132.
- [12] Albino M, Giampaolo R, Armando M, et al. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59:276-282.
- [13] Vivian T, Helenice M. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164:1543-1547.
- [14] Aloni B, Cohen R, Karni L, et al. Hormonal signaling in rootstock-scion interactions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 127:119-126.
- [15] Zvi P, Eduardo B. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14:290-295.
- [16] 曾庆钱, 陈厚彬, 鲁才浩, 等. HPLC 测定荔枝不同器官中内源激素流程的优化[J]. *果树学报*, 2006, 23(1):145-148.
- [17] 孔祥生, 易现峰. 植物生理学试验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008:124-270.
- [18] 林文雄, 吴杏春, 梁康迳, 等. 臭氧浓度增强对水稻多胺代谢及内源激素含量的影响[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(7):807-813.
- [19] 江铃, 王章荣, 周燮. 镉对马尾松苗的根系生长和 IAA 含量的影响[J]. *植物学报*, 1998, 40(3):251-255.
- [20] 江铃, 周燮, 王章荣. 硝酸镉对马尾松苗的生长及内源激素含量的影响[J]. *南京农业大学学报*, 1998, 21(2):1-6.
- [21] 袁祖丽, 吴中红. 镉胁迫对烟草根抗氧化能力和激素含量的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(15):4109-4118.
- [22] Li X J, Li S Y, Lin J X. Effect of GA3 spraying on lignin and auxin contents and the correlated enzyme activities in bayberry (*Myrica rubra* Bieb.) during flower-bud induction[J]. *Plant Science*, 2003, 164:549-556.