

纪广影,丁伟,高文逸,等. 氟磺胺草醚抑制大豆根瘤固氮酶活性与碳代谢关系的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):92-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.022

氟磺胺草醚抑制大豆根瘤固氮酶活性与碳代谢关系的研究

纪广影,丁伟,高文逸,赵慧凝

(东北农业大学农学院植保系,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:采用田间试验方法,用氟磺胺草醚对大豆茎叶进行处理。测定大豆根瘤固氮酶活性与叶片光合速率、根瘤细胞浆中蔗糖含量、根瘤蔗糖合成酶活性的相关性,揭示氟磺胺草醚抑制根瘤固氮酶活性与碳代谢的关系。结果表明,用氟磺胺草醚处理茎叶后,固氮酶活性、光合速率、根瘤细胞浆蔗糖含量、根瘤蔗糖合成酶活性明显受到抑制,且随着施药时间的延长,抑制作用逐渐减弱。氟磺胺草醚的用量为 337 g a. i./hm² 时,14、21 d 后固氮酶活性与叶片光合速率呈显著正相关,7、21 d 后固氮酶活性与根瘤蔗糖合成酶呈显著正相关;氟磺胺草醚的用量为 675 g a. i./hm² 时,28 d 后固氮酶活性与根瘤细胞浆中蔗糖含量呈显著正相关。施用氟磺胺草醚后,大豆叶片光合作用受到抑制,根瘤中同化产物供应不足是根瘤固氮酶活性受抑制的重要原因。

关键词:氟磺胺草醚;大豆根瘤;固氮酶活性;碳代谢;光合速率;蔗糖合成酶活性;相关性;安全性评价依据

中图分类号:S482.4⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)08-0092-04

大豆是我国重要的粮食作物之一^[1]。大豆不同于其他非豆科植物的显著特点是,土壤中的根瘤菌侵染根表皮细胞形成根瘤,将空气中的 N₂ 逐步转化为 NH₃ 并吸收利用进而

完成蛋白质合成。大豆根瘤的共生固氮作用为大豆生长提供了重要的氮素来源,对大豆产量和品质提高具有非常重要的作用^[2]。氟磺胺草醚是目前国内大豆生产中最常用的除草剂之一,具有选择性,主要用于旱田除草,在花生、大豆田中防除阔叶杂草极为有效。目前,关于除草剂对根瘤固氮影响的研究结果表明,除草剂可以破坏土壤微生物的生长环境,抑制根瘤的生长发育、结瘤及固氮能力^[3-4];除草剂抑制碳代谢,导致同化产物合成和运输受到障碍,从而影响根瘤能量供应^[5-7]。国内的研究多集中在除草剂对根际环境、根瘤菌及根瘤生长发育的影响;国外的研究多侧重于除草剂对根瘤固氮酶活性的影响,酰胺类除草剂异丙草胺和有机磷类除草剂

收稿日期:2016-11-21

基金项目:黑龙江省留学归国基金项目(编号:LC2011C01);黑龙江省青年科学基金项目(编号:QC07C45);哈尔滨市青年科技人才专项基金(编号:2007RFQXN012)。

作者简介:纪广影(1991—),女,黑龙江佳木斯人,硕士研究生,主要从事除草剂作用原理相关研究。E-mail:somnusjgy@163.com。

通信作者:丁伟,博士,教授,主要从事除草剂作用原理与转基因作物安全性评价相关研究。E-mail:285834012@qq.com。

抗病基因库的组建[J]. 植物保护,2008,34(1):49-52.

[9]王竹林,何中虎,段霞瑜,等. 54 份 CIMMYT 小麦材料抗白粉病分析[J]. 西北植物学报,2007,27(10):1973-1979.

[10]曹学仁,周益林,段霞瑜,等. 我国主要麦区 101 个小麦品种(系)的抗白粉病基因推导[J]. 麦类作物学报,2010,30(5):948-953.

[11]薛飞,段霞瑜,周益林,等. 部分小麦农家品种抗白粉病基因推导与遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报,2009,29(2):228-235.

[12]杨立军,曾凡松,龚双军,等. 68 个主推小麦品种的白粉病抗性分析及基因推导[J]. 中国农业科学,2013,46(16):3354-3368.

[13]曹世勤,骆惠生,武翠平,等. 甘肃省主要小麦生产品种(系)及抗源材料抗白粉病基因推导分析[J]. 作物学报,2010,36(12):2107-2115.

[14]盛宝钦. 用反应型记载苗期小麦白粉病[J]. 植物保护,1989,14(1):49.

[15]盛宝钦,段霞瑜. 对记载成株小麦白粉病“0~9 级法”的改进[J]. 北京农业科学,1991,9(1):38-39.

[16]Parks R, Carbone I, Murphy J P, et al. Virulence structure of the

Eastern US wheat powdery mildew population[J]. Plant Disease, 2008,92(7):1074-1082.

[17]曹世勤,张勃,李明菊,等. 甘肃省 50 个主要小麦品种(系)苗期抗条锈基因推导及成株期抗病性分析[J]. 作物学报,2011,37(8):1360-1371.

[18]Liu T G, Peng Y L, Chen W Q, et al. First detection of virulence in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China to resistance genes *Yr24* (= *Yr26*) present in wheat cultivar Chuanmai 42[J]. Plant Disease, 2010,94(9):1163.

[19]刘太国,章振羽,刘博,等. 小麦抗条锈病基因 *Yr26* 毒性小种的发现及其对我国小麦主栽品种苗期致病性分析[J]. 植物病理学报,2015,45(1):41-47.

[20]Bousset L, Chèvre A M. Stable epidemic control in crops based on evolutionary principles: adjusting the metapopulation concept to agro-ecosystems[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2013,165:118-129.

[21]Zheng W, Huang L, Huang J, et al. High genome heterozygosity and endemic genetic recombination in the wheat stripe rust fungus[J]. Nature Communications, 2013,4:2673.

草甘膦对根瘤固氮酶活性均有显著的抑制作用^[5,8-9]。关于氟磺胺草醚对大豆根瘤固氮影响的研究较少,但氟磺胺草醚仍是我国大豆生产中常用的除草剂之一。根瘤固氮作用在根瘤的类菌体中进行,这一化学反应需要光合作用合成的碳水化合物作为能源。本试验以氟磺胺草醚对大豆光合碳代谢影响为切入点,研究不同剂量氟磺胺草醚对大豆叶片光合速率、根瘤细胞浆蔗糖含量、根瘤蔗糖合成酶活性的影响,及其与固氮酶活性的相关性,从而揭示氟磺胺草醚抑制大豆根瘤固氮活性的生理机制,以期为正确评价氟磺胺草醚对大豆的安全性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验在东北农业大学校内试验基地进行,供试大豆品种为东农 50,供试除草剂为 250 g/L 氟磺胺草醚水剂。试验共设 2 个处理,氟磺胺草醚施用剂量分别为 337、675 g a.i./hm²,并以未施氟磺胺草醚的处理作空白对照,每个处理 4 次重复。大豆于 2016 年 5 月 2 日播种,在大豆第 3 张复叶完全展开时,用 250 g/L 氟磺胺草醚水剂对茎叶进行处理。分别于施药 7、14、21、28 d 后取样,每个小区挖取 10~15 株大豆完整根系,带回实验室测定相关指标。

1.2 测定方法

1.2.1 光合速率的测定 采用美国产 Li-6400XT 便携式光合速率测定仪测定大豆叶片光合速率。叶室 CO₂ 浓度设定为 400 μmol/CO₂ mol,温度为 22.5 °C,空气相对湿度为 40%~50%。施药 7、14、21、28 d 后,在晴天 09:00—11:00,于每个处理小区中间 2 行随机选 3 株大豆的相同部位测定完全展开叶片的光合速率。

1.2.2 固氮酶活性的测定 参照 Zablotowicz 等的方法并经过改进,利用日本岛津 GC-14C 气相色谱分析仪,采用乙炔还原法活体测定固氮酶活性^[10-11]。取 2 根完整的大豆根系放入具塞血清瓶中,用橡皮塞封闭,先用注射器从瓶中抽出 5.0 mL 空气,再向瓶中注入 5.0 mL 乙炔气体,28 °C 反应 2 h,反应结束后,用微量进样器分别抽取 1.0 mL 反应瓶中的混合气体,注入气相色谱仪测定乙烯含量。

气相色谱柱为长 2 m 的不锈钢填充柱,固定相为 GDX-502,氢火焰离子检测器,柱温为 65 °C,检测室温度为 110 °C,气化室温度为 110 °C;用 N₂ 做载气,流量为 35 mL/min;燃气 (H₂) 压力为 0.8 kg/cm²,空气压力为 1.6 kg/cm²。

1.2.3 大豆根瘤细胞浆中蔗糖含量的测定 将大豆根瘤中心的类菌体去掉,剩余部分即为细胞浆,采用张志良等的间苯二酚比色法测定细胞浆内的蔗糖含量^[12]。

1.2.4 大豆根瘤蔗糖合成酶活性测定 粗酶液提取:取约 1 g 预冷样品,加入 3 mL 提取介质(100 mmol pH 值为 7.2 的 Tris-HCl、10 mmol MgCl₂、1 mmol 乙二胺四乙酸二钠、10 mmol 巯基乙醇、2% 乙二醇、1% 交联聚乙烯吡咯烷酮,各 0.5 mL)于研钵中快速研磨成均匀糊状后,再用 2 mL 提取介质清洗研钵 2 次,倒入离心管中,12 000 r/min 低温冷冻高速离心机离心 10 min。取上清液测定蔗糖合成酶合成方向的活性,以上过程均在 4 °C 下进行。

蔗糖合成酶分解方向活性的测定:每个处理取 4 只试管,

各加入 0.2 mL 粗酶液(对照加入 0.2 mL 2 mol/L NaOH),加 0.6 mL 分解反应介质(100 mmol pH 值为 7.2 的 Tris-HCl、10 mmol MgCl₂、5 mmol 尿苷二磷酸葡萄糖、50 mmol 蔗糖,各 0.15 mL),在 30 °C 水浴 30 min 后,再沸水浴 5 min,加入 0.2 mL 2 mol/L NaOH 混匀,再加入 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸在沸水中加热 5 min,冷却,再加入 4 mL 蒸馏水,在 540 nm 处比色^[13]。

1.3 数据分析和计算

用 Excel 对试验数据进行整理,用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 氟磺胺草醚对固氮酶活性的影响

由图 1 可知,在施药的 28 d 内,氟磺胺草醚对根瘤固氮酶活性一直有抑制作用。337、675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚对固氮酶活性的抑制率分别达 12.42%~15.61%、18.30%~28.28%。337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚在处理 21 d 后时抑制率达到最高值,之后减小;675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚在处理 14 d 后时抑制作用最强,在 28 d 后时抑制作用最弱。且高剂量处理下的抑制作用大于低剂量。

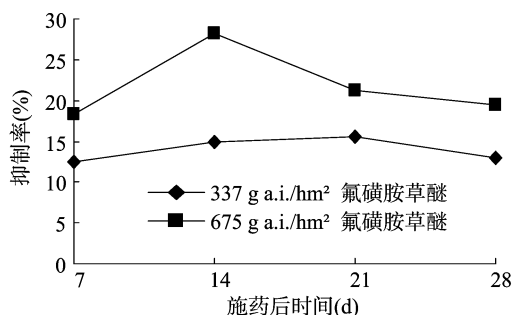


图1 氟磺胺草醚对固氮酶活性的抑制率

2.2 对光合速率的影响

2.2.1 氟磺胺草醚对光合速率的影响 由图 2 可知,施用不同剂量的氟磺胺草醚后,对光合速率的抑制作用明显,337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚对光合速率的抑制率最高值达 16.89%,675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚对光合速率的抑制率最高值为 20.19%,且都出现在施药 21 d 后时,之后抑制作用减弱,光合速率恢复正常。

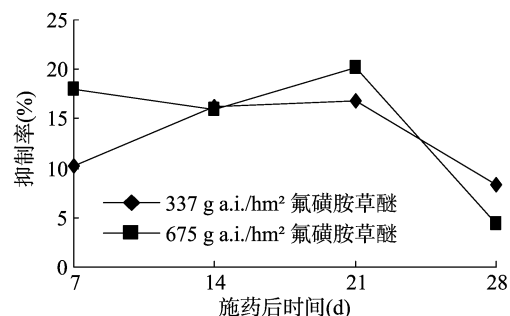


图2 氟磺胺草醚对光合速率的抑制率

2.2.2 氟磺胺草醚对根瘤固氮酶活性影响与光合速率的关系 由图 3、图 4 可知,2 个剂量的氟磺胺草醚处理下,根瘤固氮酶活性与叶片光合速率在测定的时间点均呈正相关,分别在 14、21 d 后及 21、28 d 后呈显著正相关,表明根瘤固氮酶活

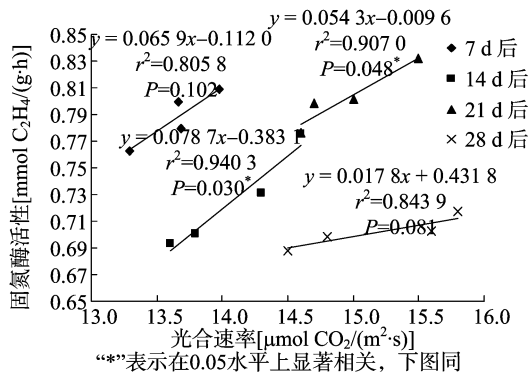


图3 施用 337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚7、14、21、28 d 后固氮酶活性与光合速率的相关关系

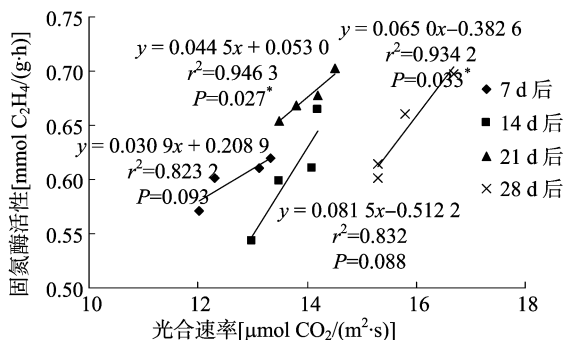


图4 施用 675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚7、14、21、28 d 后固氮酶活性与光合速率的相关关系

性高低与光合速率显著相关。

2.3 对蔗糖含量的影响

2.3.1 氟磺胺草醚对根瘤细胞浆中蔗糖含量的影响 由图5可知,施用氟磺胺草醚后,根瘤细胞浆中蔗糖含量与对照相比,均受到不同程度的抑制,337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚在处理14 d后时的抑制率最高,为30.95%,675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚在处理7 d后时的抑制率最高,为36.29%。且随着施药时间的延长,抑制作用逐渐减弱,蔗糖含量恢复正常。

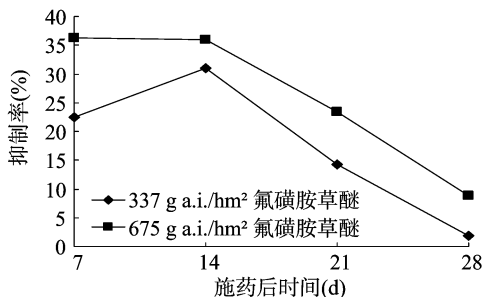


图5 氟磺胺草醚对大豆根瘤细胞浆中蔗糖含量的抑制率

2.3.2 氟磺胺草醚对根瘤固氮酶活性影响与根瘤细胞浆中蔗糖含量关系 由图6、图7可知,不同处理下固氮酶活性与根瘤细胞浆中蔗糖含量之间呈正相关;施用675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚时,在28 d后固氮酶活性与根瘤细胞浆中蔗糖含量之间呈显著正相关,说明固氮酶活性与根瘤浆细胞中蔗糖的含量存在一定的相关关系。

2.4 对蔗糖合成酶的影响

2.4.1 氟磺胺草醚对根瘤蔗糖合成酶活性的影响 由图8

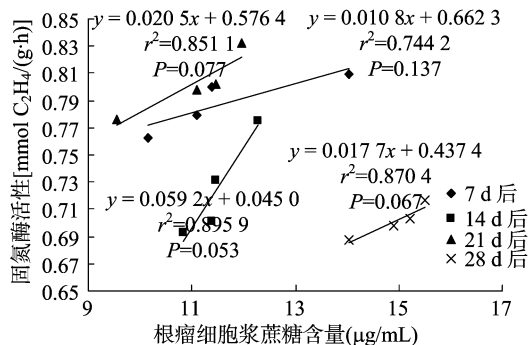


图6 施用 337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚7、14、21、28 d 后固氮酶活性与根瘤细胞浆蔗糖含量的相关关系

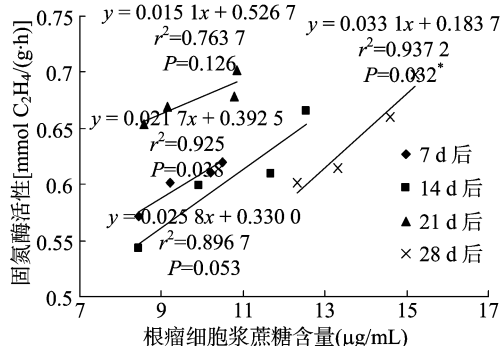


图7 施用 675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚7、14、21、28 d 后固氮酶活性和根瘤细胞浆蔗糖含量相关关系

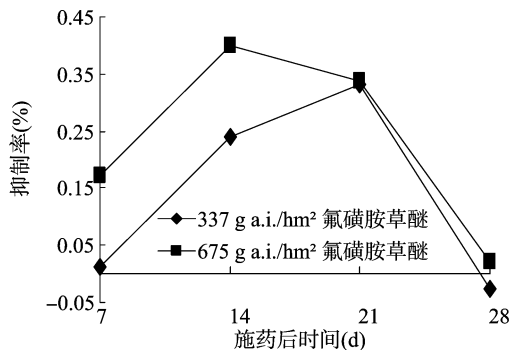


图8 氟磺胺草醚对大豆根瘤蔗糖合成酶活性的抑制率

可知,在337、675 g a.i./hm²用量下,氟磺胺草醚对根瘤蔗糖合成酶活性的抑制率分别在21、14 d后时达到最高值,分别为33.08%、39.94%,随着施药时间的延长,抑制率逐渐减小,根瘤蔗糖合成酶活性逐渐恢复到正常水平,但高剂量处理下的抑制作用时间较长,恢复较慢。

2.4.2 氟磺胺草醚对根瘤固氮酶活性影响与根瘤蔗糖合成酶活性关系 由图9、图10可知,施用337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚7、21 d后,固氮酶活性与根瘤蔗糖合成酶活性呈显著正相关;施用675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚,在测定的28 d内固氮酶活性与根瘤蔗糖合成酶活性均呈显著正相关。

3 结论与讨论

氟磺胺草醚的作用靶标是植物体内原卟啉原氧化酶,原卟啉原氧化酶固定于叶绿体内,是催化叶绿素与亚铁原卟啉生物合成最后阶段的酶,此种酶被抑制可造成对光敏感的原卟啉原IX迅速积累^[14],在光合分子氧存在的条件下原卟啉

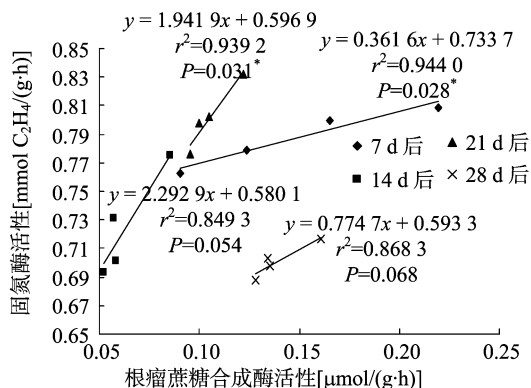


图9 施用 337 g a.i./hm² 氟磺胺草醚 7、14、21、28 d 后固氮酶活性与根瘤蔗糖合成酶活性的相关关系

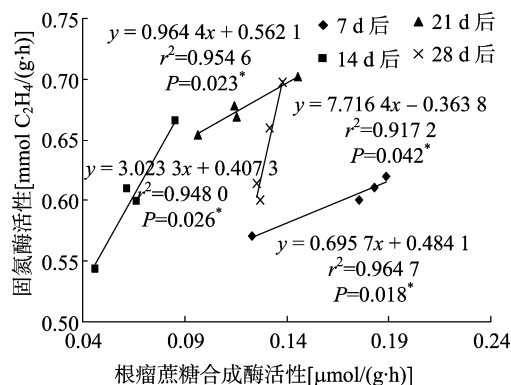


图10 675 g a.i./hm² 氟磺胺草醚 7、14、21、28 d 后固氮酶活性与根瘤蔗糖合成酶活性的相关关系

原产生单态氧,使脂膜过氧化最终造成细胞死亡。氟磺胺草醚施药 1~3 d 后,叶片有明显的坏死斑点等药害症状,说明叶片的光合作用受到影响^[15]。

以碳的同化为核心的光合作用是植物生长发育过程中最基本的物质和能量来源,是碳代谢中的重要部分^[16]。蔗糖是高等植物光合作用的主要产物,又是叶片光合产物向各器官运输的主要形式^[17],而蔗糖合成酶既可以催化蔗糖的合成也可以催化蔗糖的分解,对植物体内蔗糖的代谢起着至关重要的作用,代表着植物碳代谢的水平^[18]。根瘤中的固氮作用在类菌体中进行,类菌体利用光合产物蔗糖呼吸作用产生电子及能量腺嘌呤核苷三磷酸,从而把 N₂ 还原成 NH₄⁺^[19]。

氟磺胺草醚对根瘤细胞浆蔗糖含量的抑制作用在 14 d 后时最强,此时固氮酶活性明显降低。施药 28 d 后时,氟磺胺草醚对根瘤蔗糖合成酶活性的抑制作用最弱,与对照相比,细胞浆蔗糖含量无明显差异。光合速率的高低也影响着固氮酶活性。同时发现,在高剂量(675 g a.i./hm²)氟磺胺草醚处理下,各项指标受到的抑制作用更强且持续时间较长,正常剂量(337 g a.i./hm²)氟磺胺草醚处理下根瘤固氮和碳代谢受到影响的程度要轻于高剂量,且之后可恢复正常水平。

本研究中,在氟磺胺草醚处理后,固氮酶活性与叶片光合速率呈显著正相关,高剂量氟磺胺草醚处理下根瘤细胞浆蔗糖含量在 28 d 后与根瘤固氮酶活性呈显著正相关,且氟磺胺草醚与根瘤蔗糖合成酶活性也呈显著正相关。结果表明,固氮酶活性的变化受到叶片光合速率、根瘤细胞浆蔗糖含量及根瘤蔗糖合成酶活性的影响,大豆光合作用受到抑制,产生的

能量减少,从而使根瘤细胞浆内的蔗糖含量减少,根瘤蔗糖合成酶活性受到抑制,导致大豆根瘤固氮时可以利用的能量与碳源减少,根瘤固氮酶活性受到抑制。

施用氟磺胺草醚后,叶片光合速率、根瘤细胞浆中的蔗糖含量、根瘤蔗糖合成酶活性均与根瘤固氮酶活性呈正相关。碳代谢受到抑制,同化产物供应不足是氟磺胺草醚抑制固氮酶活性的重要原因。正常剂量的氟磺胺草醚对根瘤固氮和碳代谢有短时间的不利影响,后期可恢复。

参考文献:

- [1] 邸伟. 大豆根瘤固氮酶活性与固氮量的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [2] Harper J E. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production[J]. Crop Science, 1974, 14(2): 255-260.
- [3] 王利平,王金信,孙艾蕊,等. 4 种除草剂对紫花苜蓿-根瘤菌共生固氮的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊1): 114-117.
- [4] 丁伟. 除草剂对大豆生产的安全性评价[M]. 北京:中国农业出版社, 2010: 160-161.
- [5] Zimdahl R L, Clark S K. Degradation of three acetanilide herbicides in soil[J]. Weed Science, 1982, 30(5): 545-548.
- [6] 丁伟,杨隆华,程苗,等. 氟磺胺草醚对大豆根瘤固氮酶活性及光合速率的影响[J]. 作物杂志, 2010(4): 81-84.
- [7] 程苗,杨隆华,丁伟,等. 氟磺胺草醚对大豆根瘤固氮和蔗糖代谢的影响[J]. 作物杂志, 2011(6): 24-27.
- [8] Ding W, Reddy K N, Krutz L J, et al. Biological response of soybean and cotton to aerial glyphosate drift [J]. Journal of Crop Improvement, 2011, 25(3): 291-302.
- [9] Zablutowicz R M, Reddy K N. Nitrogenase activity, Nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean [J]. Crop Protection, 2007, 26(3): 370-376.
- [10] Zablutowicz R M, Reddy K N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview [J]. Journal of Environmental Quality, 2004, 33(3): 825-831.
- [11] Ding W, Reddy K N, Zablutowicz R M, et al. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate [J]. Chemosphere, 2011, 83(4): 593-598.
- [12] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社, 2003.
- [13] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [14] 苏少泉. 靶标原卟啉氧化酶除草剂的发展[J]. 农药, 2005, 44(8): 342-346.
- [15] 杨隆华. 乙草胺、氟磺胺草醚对大豆根瘤固氮和碳代谢的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2010.
- [16] 郑宝香,满为群,杜维广,等. 高光效大豆光合速率与主要光合生理指标及农艺性状的关系[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 397-401.
- [17] 王艳杰,郑殿峰,张晓艳,等. DTA-6 浸种对大豆苗期叶片碳代谢的影响[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(14): 80-81.
- [18] 傅金民,张庚灵. 大豆籽粒形成期¹⁴C 同化物的分配和源库调节效应的研究[J]. 作物学报, 1999, 25(2): 169-173.
- [19] 徐晔,张金池,王广林,等. 固氮酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2011, 28(4): 61-64.