

刘朝茂, 李成云. 玉米与大豆间作对玉米叶片衰老的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2) : 322-326.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.013

玉米与大豆间作对玉米叶片衰老的影响

刘朝茂¹, 李成云²

(1. 西南林业大学林学院/云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程研究中心/教育部农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室/云南农业大学植物病理重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要: 采用玉米/大豆2:2间作和玉米净作的小区试验, 检测与衰老相关酶在不同生育期的活性, 并利用RT-PCR技术, 检测不同生育期玉米衰老相关基因的表达情况。结果表明, 与净作种植的玉米相比, 间作种植的玉米能够维持较高的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 有效增加叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白含量, 降低丙二醛(MDA)含量, 有效延缓植物衰老。通过分析比较玉米/大豆间作种植与玉米净作种植模式下玉米衰老相关基因的表达情况, 发现间作种植模式下玉米SGR1、SGR2、VP14和CC2基因在灌浆期和成熟期的表达量均低于玉米净作种植模式下的, 而延缓衰老的基因KNI在玉米/大豆2:2间作种植模式下的表达量略高于玉米净作种植模式下的, 这从基因水平证实了玉米/大豆间作能够延缓玉米植株的衰老。

关键词: 玉米; 大豆; 间作; 衰老

中图分类号: S344.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0322-05

Effects of maize/soybean intercropping on maize leaf senescence

LIU Chao-mao¹, LI Cheng-yun²

(1. Forestry College, Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Southwest Forestry, Kunming 650224, China; 2. The National Center for Agricultural Biodiversity, Ministry of Education/Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Plant Disease Management/Key Laboratory of Plant Pathology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: An experiment consisting of two cropping patterns (2-row maize/2-row soybean intercropping and maize monoculture) was conducted to detect the activities of senescence-related enzymes at different growth stages. Expression of maize senescence-related genes at different growth stages were detected by RT-PCR. Results showed that the enzymes activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were maintained at higher levels, and the contents of chlorophyll, soluble sugar and soluble protein were higher in maize leaves intercropped with soybean, but the content of malondialdehyde (MDA) was decreased, effectively delaying senescence. The expressions of SGR1, SGR2, VP14 and CC2 in intercropped maize at filling and maturity were lower than those in monocultured maize, but the expression of senescence-delaying gene KNI was higher, confirming that the maize/soybean intercropping could delay maize senescence at gene level.

收稿日期: 2016-11-10

基金项目: 国家“973”计划项目(2011CB100403)

作者简介: 刘朝茂(1987-), 男, 云南彝良人, 硕士, 助理实验师, 从事森林病理学研究。(Tel) 15288139795; (E-mail)

lcm1987swkx@163.com

通讯作者: 李成云, (Tel) 13708705575; (E-mail) li.chengyun@gmail.com

senescence at gene level.

Key words: maize; soybean; intercropping; senescence

植物生长到一定阶段, 其体内某些细胞、器官和组织有序死亡的过程被称为植物衰老。植物体自身

启动和运行死亡的全过程,被称作程序化死亡(Programmed cell death,PCD)^[1]。植物叶片衰老最明显的外部现象是植物叶片颜色由绿变黄甚至脱落,在细胞水平上则表现为叶绿体、糖类等物质的分解释放,光合速率和蒸腾速率降低,膜脂过氧化加剧,细胞分裂素含量下降等。分子水平上表现为蛋白质、核酸等生物大分子降解,并且降解产物被转运到幼嫩的组织中加以利用和储存^[2]。有研究发现,当植物衰老时其体内会产生一些保护自己不受外界损伤并且能够长时间维持自身活力的组分^[3]。植物叶片的衰老不仅预示着植物同化能力的丧失和光合系统的破坏,随着植物叶片的衰老,植物自身也会在细胞及分子水平上产生一系列生理生化变化。

不同作物多样性种植能够提高作物对养分的利用率。尤其禾本科与豆科作物间作或套种在农业生产中具有重要的意义和作用^[4-10]。豆科作物对氮的需求量很少,其根部产生的根瘤菌具有固氮能力,能为禾本科作物补充一定的氮源,提高作物群体的光合面积,提高作物的光合速率,增加作物对资源的利用率^[11]。刘天学等^[12]研究了不同基因型玉米间作对玉米叶片衰老、籽粒产量和品质的影响,结果表明具有不同特性的基因型玉米间作,可以提高叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性,增强清除氧自由基的能力,使丙二醛(MDA)含量保持较低水平,延缓叶片衰老,维持较高的叶面积,提高光合利用效率等。在控制作物病害方面,不同作物间作还能改善田间小气候,起到通风透光,降低作物叶片表面湿度,稀释病原菌的作用,有效控制作物病害的发生与发展,减少农药的使用量^[13-14],增加粮食作物的产量。本试验拟在前期研究的基础上,探讨玉米与大豆间作对玉米叶片衰老的影响,以期多样性种植提高作物产量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米品种为云瑞6号,大豆品种为华严1号。

1.2 试验设计

试验在云南农业大学后山茶苑试验田进行。试验地为壤土,地势平坦,排灌方便,地力均匀。试验采用完全随机区组设计,净作和间作处理,分别是玉米净作处理(A)、玉米与大豆行比2:2间作处理

(B),3次重复,6个小区。采用南北行向种植,每个处理株距、行距分别是:玉米净作时株距30 cm,行距40 cm;玉米与大豆间作中,玉米与玉米之间株距为30 cm,大豆与大豆之间株距为35 cm,玉米与玉米之间行距为40 cm,玉米与大豆之间行距为30 cm,大豆与大豆之间行距为30 cm。小区面积为4 m×5 m,小区四周留1 m宽隔离带。试验地播种前翻地,泼洒农家肥作为基肥,使得地力均匀、肥力中等,于2011年5月5日播种,9月14日收获。大豆、玉米播种均采用人工开沟点播,玉米每穴2~3颗,大豆3~4颗,覆土落实。与此同时,追加复合肥,播种后保证正常的水肥管理。

1.3 试验方法

1.3.1 衰老相关生理指标的测定 在玉米成熟后期对玉米叶片衰老相关生理指标进行测定。SOD活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法^[15]。POD活性测定采用愈创木酚显色法^[16],酶活性以1 min OD_{470} 增加0.01为1个酶活力单位(U),酶活性以 $U/(g \cdot min)$,FW表示。CAT活性测定采用紫外吸收法^[17],以1 min内 A_{240} 降低0.1(3支试管的平均值)为1个酶活力单位(U),酶活性以 $U/(g \cdot min)$,FW表示。MDA含量测定采用硫代巴比妥酸法^[18]。可溶性糖含量测定采用苯酚法^[15]。可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝G250法^[17]。叶绿素含量测定采用丙酮提取法^[15]。

1.3.2 半定量RT-PCR检测玉米间作种植模式下衰老相关基因的表达 采用Trans-Zol UP提取玉米样品RNA,对RNA样品中的DNA进行消化和纯化。从NCBI数据库中获取玉米 $actin$ 基因($Zm-Actin$, GenBank:J01238.1)的cDNA序列,并设计RT-PCR引物($\beta-actin$ F: 5'-CCATGAGGCCACGTACAAC-3', $\beta-Actin$ R: 5'-GGTAAAACCCCACTGAGGA-3',产物172 bp),通过PCR对DNase处理后的RNA样品进行 $actin$ 检测。cDNA合成,选取DNase处理完全的RNA,利用反转录试剂盒TransScript II First-Strand cDNA Synthesis Supermix进行cDNA合成。利用软件Primer 5.0和NCBI在线Primer-BLAST设计PCR引物(表1)。以玉米 $actin$ 基因作为内参基因,序列由Invitrogen公司合成。PCR扩增^[19],采用25 μ l反应体系进行PCR,包括cDNA、dNTPs、10× Buffer(含 $MgCl_2$)、 Vaq 酶(1.25 U)和上、下游引物,ddH₂O补足至25 μ l。PCR反应程序为:94℃预变

性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,52 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。以 1.5% 琼脂糖

凝胶检测 PCR 产物,用凝胶成像系统 (Bio-Rad) 在标准紫外光下成像。

表 1 玉米衰老相关基因 PCR 引物

Table 1 PCR primers for maize senescence-related genes detection

基因	登录号	功能描述	引物	产物大小 (bp)
<i>Zm-SGR1</i>	NM_001112300.1	衰老相关基因 1 ^[20]	5'-GACGGTCCAGGAAGCCAATC-3' 5'-CGGATGGATGACGGATCGAG-3'	126
<i>Zm-SGR2</i>	NM_001112301.1	衰老相关基因 2 ^[20]	5'-GAAGCCGTGCAAGTTTCCTG-3' 5'-GCTGCGGCCATGTTATGTTG-3'	170
<i>Zm-KN1</i>	NM_001111966.2	转录调节相关基因 ^[21]	5'-AACTTCATCTCATCTCCAGGCG-3' 5'-TGCGCCAACTCCAAAGTGTT-3'	152
<i>Zm-VP14</i>	U95953.1	激素响应途径相关基因 ^[22]	5'-TCACCAAGTTCGAGTACGGC-3' 5'-CGGCATTGACCACAAGTAGC-3'	162
<i>Zm-CC2</i>	AM055631.1	蛋白质分解相关基因 ^[23]	5'-CTGCCCTGCTCATACTGC-3' 5'-GGTGAAGGTCGTTCTCGTT-3'	158

Zm-SGR1、*Zm-SGR2*:促进叶绿素分解的基因;*Zm-KN1*:延缓玉米叶片分解的转录因子;*Zm-VP14*:脱落酸信号途径相关基因;*Zm-CC2*:蛋白质分解相关基因。

2 结果与分析

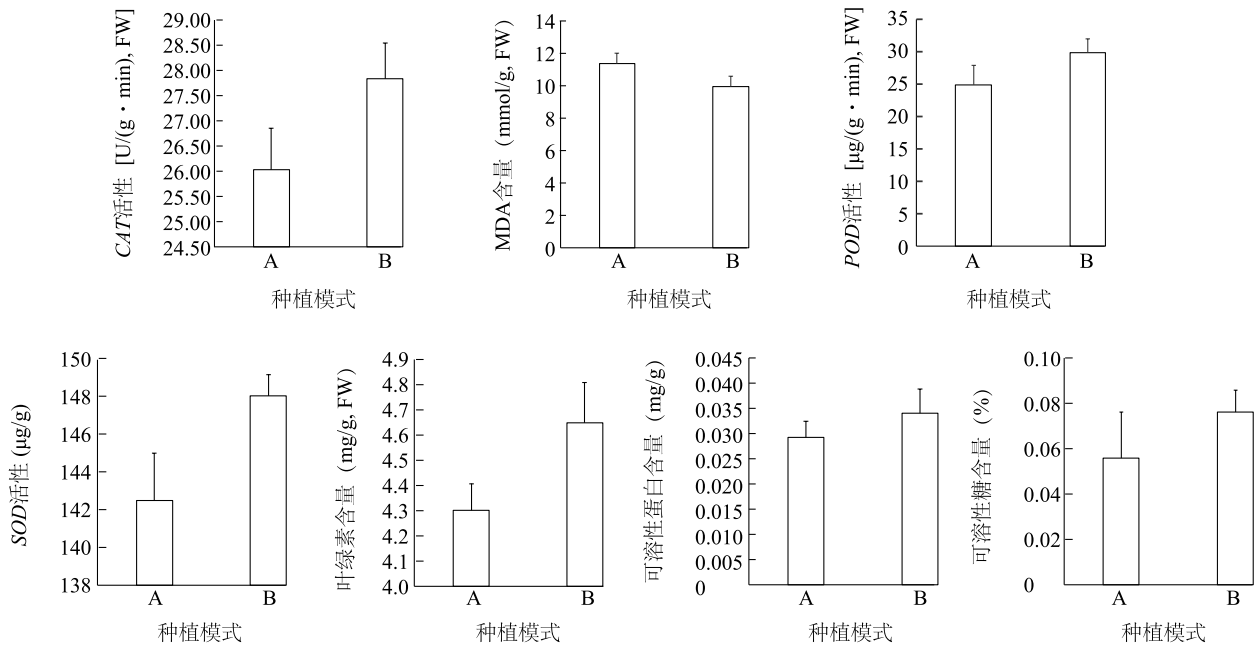
2.1 玉米与大豆间作种植对玉米叶片衰老的影响

通过检测植物体内与防御相关酶的活性和相关生理指标发现,在与大豆间作种植模式下,玉米的叶片防御酶活性及相关生理指标与净作种植模式下的不同。如图 1 显示,玉米/大豆 2:2 间作种植模式下玉米的过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶的酶活性均高于净作种植模式下的,间作种植模式下玉米中丙二醛含量低于净作种植模式下的,玉米叶绿素含量、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量 3 项生理指标均表现为玉米/大豆 2:2 间作种植模式下的高于玉米净作种植模式下的。这些结果均表明,玉米/大豆间作种植模式下玉米的防御能力和抗衰老能力均优于净作种植模式下的。

2.2 玉米与大豆间作种植模式下玉米衰老相关基因 RT-PCR 结果

玉米与大豆间作种植,分别在玉米灌浆期和成熟期采集玉米一定叶位的叶片来提取总 RNA,经反转录后获得 cDNA,以玉米 β -actin 基因作为内参基因,每个处理重复 3 次,RT-PCR 检测结果(图 2)显

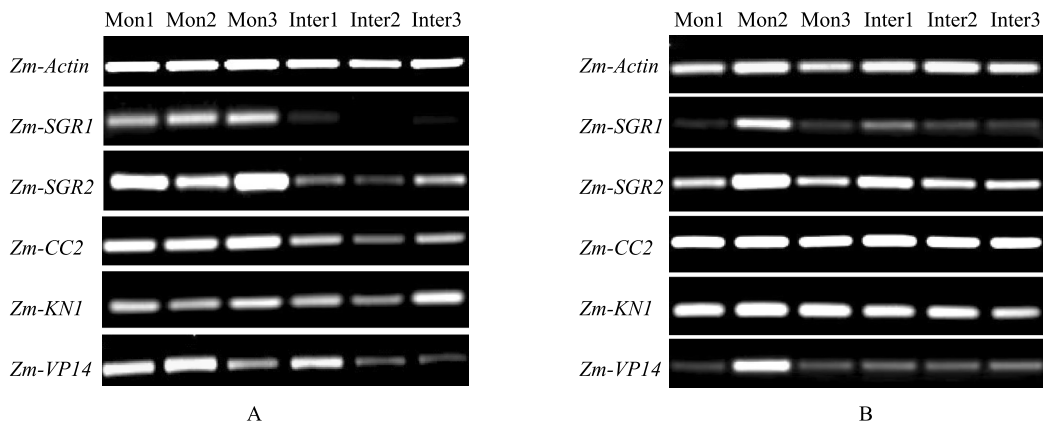
示,在玉米灌浆期,5 个衰老相关基因在 2 种植模式下都检测到表达,净作与间作种植模式下的表达情况相比,除 *KN1* 基因外,其他 4 个衰老相关基因在间作模式下的表达量均低于净作模式下的。促进衰老的 *SGR1* 基因和 *SGR2* 基因的表达量在净作模式下可见条带比较清晰,其表达量较高,而在 2:2 间作种植模式下 RT-PCR 的条带很弱或几乎看不到,即其表达量很小或几乎没有表达(图 2A)。在玉米成熟期,5 个衰老相关基因在 2 种植模式下也都检测到了表达,净作与间作种植模式下的基因表达量相比,*KN1* 和 *CC2* 的基因表达量差异较小,其余 3 个基因在间作种植模式下的表达量都明显低于净作种植模式下的(图 2B)。在玉米灌浆期和成熟期,促进衰老的基因(*SGR1*、*SGR2*、*CC2*、*VP14*)在间作种植模式下的表达量均低于净作种植模式下的,而延缓衰老的基因(*KN1*)在间作种植模式下的表达量略高于净作种植模式下的,这表明玉米与大豆间作能够延缓衰老相关基因的表达。此外,可能因为试验过程中的 RNA 降解或试验操作误差等原因,导致部分基因 3 个重复之间结果的一致性较差(如成熟期间作模式下的 *Zm-SGR1* 和 *Zm-VP14* 基因)。



CAT:过氧化氢酶;POD:过氧化物酶;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛。A:玉米净作种植;B:玉米与大豆行比2:2间作种植。

图1 玉米与大豆多样性种植对玉米叶片衰老生理活性的影响

Fig.1 Effects of maize/soybean intercropping on maize leaf senescence and relative physiological traits



A:灌浆期 RT-PCR 电泳结果;B:成熟期 RT-PCR 电泳结果。*Zm-SGR1*、*Zm-SGR2*、*Zm-KN1*、*Zm-VP14*、*Zm-CC2* 见表1注。Mon1~ Mon3;玉米净作种植;Inter1~ Inter3;玉米与大豆行比2:2间作种植。

图2 玉米灌浆期和成熟期衰老相关基因 RT-PCR 电泳结果

Fig.2 RT-PCR detection of senescence-associated genes of maize at filling stage and maturity

3 讨论

本试验通过测定玉米与大豆间作种植模式下的玉米衰老相关生理指标,并利用 RT-PCR 方法检测衰老相关基因的表达量,发现玉米与大豆间作能够提高叶片的 *SOD*、*POD* 和 *CAT* 活性,增强清除氧自

由基的能力,MDA 保持较低水平,从而延缓衰老。这与刘天学等^[12]研究结果相一致。玉米/大豆2:2间作种植模式下衰老相关基因 *SGR1*、*SGR2*、*VP14* 和 *CC2* 在灌浆期和成熟期的表达量均比玉米净作种植模式下的低,而灌浆期和成熟期 *KN1* 基因在玉米/大豆2:2间作种植模式下的表达量略高于玉米

净作种植模式下的。这可能是由于玉米与大豆间作,大豆能够进行生物固氮,增加玉米营养物质的供给。同时,间作还能够增加群体的光合面积,提高光合利用率,增加边际效应,减少种群间的竞争,从而使酶活性维持在较高水平,降低衰老相关基因的表达量,增加玉米的生长周期,延缓玉米衰老。但玉米与大豆间作能够提高与防御相关酶的活性并降低与衰老相关基因表达的原因,还需通过分子水平的进一步研究来确定。

虽然关于间作种植对植物叶片衰老影响的分子机制方面的研究不深,尚未形成一套可以指导生产实践的理论和体系,但是从宏观上来看,多样性种植,尤其是像玉米和这样的间作种植模式能很好地延缓叶片衰老,增加叶片寿命,维持较高的叶日积^[12],有利于群体产量的提高。以后应加强对这方面的研究,特别是对其分子机理的研究,找到最佳的多样性种植模式以减缓衰老并增加作物产量,实现多样性种植的真正价值。

参考文献:

- [1] FU Y, DING Y, LIU X, et al. Rice transformation with a senescence-inhibition chimeric gene [J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43(21): 1810-1815.
- [2] CLAUSEN S, APEL K. Seasonal changes in the concentration of the major storage protein and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(4): 669-678.
- [3] BUCHANAN-WOLLASTON V. The molecular biology of leaf senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(2): 181-199.
- [4] 熊 军, 闫海峰, 韦绍丽, 等. 木薯+花生间作对作物光合特性、农艺性状和产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 165-168.
- [5] 黄 鹏, 张恩和, 柴 强. 施氮对新灌区不同间套种植模式产量及茬口养分特性的影响 [J]. 草业学报, 2001, 10(1): 86-91.
- [6] 谢 利, 王燕芳, 马 超, 等. 棉花-孜然间作模式对土壤微生物数量及酶活性的影响 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 103-105.
- [7] 李 隆, 杨思存, 孙建好, 等. 春小麦大豆间作条件下作物养分吸收积累动态的研究 [J]. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(2): 163-171.
- [8] 杨建波, 彭东海, 覃刘东, 等. 低氮条件下间作大豆对宿根蔗内生固氮菌固氮酶活性、氮素积累及产量的影响 [J]. 南方农业学报, 2015, 46(2): 210-215.
- [9] 张恩和, 李玲玲, 黄高宝, 等. 供肥对小麦间作蚕豆群体产量及根系的调控 [J]. 应用生态学报, 2002, 13(8): 939-942.
- [10] 夏海勇, 孟维伟, 于丽敏, 等. 玉米花生间作在山东地区推广的现状与对策 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(3): 121-124.
- [11] 崔俊明, 宋长江, 卢道文, 等. 不同类型玉米杂交种高矮立体间作种植技术研究 [J]. 杂粮作物, 2005, 25(4): 253-257.
- [12] 刘天学, 李潮海, 马新明, 等. 不同基因型玉米间作对叶片衰老、籽粒产量和品质的影响 [J]. 植物生态学报, 2008, 32(4): 914-921.
- [13] ZHANG X, ZHANG L, DONG F, et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* [J]. Plant Physiology, 2001, 126(4): 1438-1448.
- [14] ZHU Y Y, FANG H, WANG Y Y, et al. Panicle blast and canopy moisture in rice cultivar mixtures [J]. Phytopathology, 2005, 95(4): 433-438.
- [15] 郑炳松. 现代植物生理生化研究技术 [M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- [16] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [17] 董树刚, 吴以平. 植物生理学实验技术 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2006.
- [18] 段咏新, 宋松泉. 钙对延缓杂交水稻叶片衰老的作用机理 [J]. 杂交水稻, 1997, 12(6): 23-25.
- [19] 杨立桃, 赵志辉, 丁嘉羽, 等. 利用实时荧光定量 PCR 方法分析转基因水稻外源基因拷贝数 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 140-144.
- [20] PARK S Y, YU J W, PARK J S, et al. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation [J]. The Plant Cell Online, 2007, 19(5): 1649-1664.
- [21] BOLDUC N, YILMAZ A, MEJIA-GUERRA M K, et al. Unraveling the KNOTTED1 regulatory network in maize meristems [J]. Genes & Development, 2012, 26(15): 1685-1690.
- [22] TAN B C, SCHWARTZ S H, ZEEVAART J A D, et al. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(22): 12235-12240.
- [23] MASSONNEAU A, CONDAMINE P, WISNIEWSKI J P, et al. Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2005, 1729(3): 186-199.

(责任编辑: 王 妮)