盐生野大豆的异黄酮积累及其生态学意义

周 三 周 明 张 硕 刘占涛 赵永娟 余天真 岳 旺*

(青岛大学医学院药理学系, 山东青岛 266021)

摘 要 以自然生长在盐碱地上的野大豆 (*Glycine soja*) 和不耐盐的栽培大豆 (*G. max*) 为材料, 测定了它们在不同盐度条件下叶片、根部和种子的异黄酮含量, 并测定了它们叶片的 *L*-苯丙氨酸含量和苯丙氨酸裂解酶 (PAL) 活性, 还测定了它们根部的结瘤量和固氮酶活性。通过两者比较, 分析了它们的大豆异黄酮代谢和盐渍环境的关系。结果表明, 盐渍处理不抑制盐生野大豆 PAL 酶的活性, 其大豆异黄酮大量积累; 相反, 盐渍处理明显抑制栽培大豆 PAL 酶活性, 其大豆异黄酮含量减少, 而大豆异黄酮合成前体 *L*-苯丙氨酸积累。结果还显示: 在盐渍条件下, 盐生野大豆根部异黄酮积累的同时, 其根瘤结瘤量较多, 且固氮酶活性也较高, 而栽培大豆随着其根部异黄酮的减少, 其根瘤结瘤量大大减少, 且固氮活性大大下降。野大豆和栽培大豆的这些差别说明, 盐生野大豆积累大豆异黄酮有其生态学意义, 这很可能是野大豆通过异黄酮次生代谢途径适应盐渍环境的一种重要机制。

关键词 盐生野大豆 栽培大豆 大豆异黄酮 盐渍环境

ISOFLAVONE ACCUMULATION IN WILD SOYBEAN UNDER SALINE CONDITIONS AND ITS ECOLOGICAL SIGNIFICANCE

Zhou San, Zhou Ming, Zhang Shuo, Liu Zhan-Tao, Zhao Yong-Juan, Yu Tian-Zhen, and Yue Wang*

Pharmac Department, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, China

Abstract Aims Some species-specific secondary metabolites are key players in the interaction between plants and their environment. An ecotype of wild soybean (*Glycine soja*), naturally growing in saline soil of Yellow River delta in Shandong Province of China, shows substantial genetically determined salt-resistance, and its isoflavone content is higher than that in many cultivated soybeans. Our objective was to investigate the relationship between isoflavone and saline condition in *Glycine soja* through experimentation.

Methods The ecotype of wild soybean mentioned above and a variety (Huiming Soybean) of cultivated soybean (*Glycine max*) from same area were cultivated under saline condition. We determined the isoflavone contents in their leaves, roots and seeds, phenylalanine ammonia lyase activities and phenylalanine contents in their leaves, the number of nodules and nitrogen-fixing enzyme activities in their roots.

Important findings Isoflavone anabolism in the wild soybean was promoted by salt while it was inhibited in the cultivated soybean. The higher isoflavones contents of the wild soybean were significantly associated with the higher activities and efficiency of nitrogen fixation in its roots. Results suggested that isoflavones, secondary metabolites of the wild soybean, played an important role in the wild soybean adapting to the saline environment. Underlying processes require further investigation.

Key words *Glycine soja*, *Glycine max*, isoflavones, saline soil

植物的次生代谢是植物在长期进化过程中与环境相互作用的结果, 植物生存环境的多样性造就了植物次生代谢产物的多样性, 不同的植物总是合成不同的次生物质, 这些次生代谢产物在协调植物与环境关系上充当着特别重要的角色, 当植物中出现某一种特定的次生物质, 而这种产物又使得此种植物在其环境中处于有利地位时, 这种植物便增加了存活和繁衍的机会, 相对而言, 那些不能合成这种

特定次生产物的植物就有被淘汰的危险 (Seigler, 1995; Hartmann, 1996; Wink, 1999; Kutchan, 2001; 阎秀峰, 2001)。因此可以认为, 植物的次生代谢与植物对环境的抗逆性有关。

野大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆 (*Glycine max*) 的近缘祖先种, 具有广泛的适应性, 生态类型多样 (徐豹等, 1985, 1986; 王连铮, 1985; 李福山, 1994), 其中有自然生长在盐碱地上的生态群体 (本文称之为

为“盐生野大豆”)这种生态型对盐渍环境具有很强的抗逆性(王洪新等,1997;Zhou & Zhao,2003),但是目前对其抗盐性机制知之甚少,特别是对其抗盐机制是否涉及其次生代谢过程未见报道。

大豆异黄酮代谢是大豆等豆科植物中的主要次生代谢途径,已有的研究表明大豆异黄酮能在某些豆科植物抵抗逆境过程中发挥多种重要的生态作用:在植物的地上部,大豆异黄酮的产生,可抵抗植物病原微生物的侵袭(Harborne *et al.*,1976;Ade-sanya *et al.*,1986),对草食性昆虫具有毒害作用和趋避作用(Lane *et al.*,1985),其苦涩味还可降低草食动物取食兴趣(黄天芳,2003),其类雌激素活性能抑制摄食动物的生育力以保护自身等(杜近义等,1999);在地下部,豆科植物根系分泌异黄酮类化合物对根瘤菌有趋化作用,还是根瘤菌结瘤基因的诱导物质(Kosslak *et al.*,1987;Caetano-Anolles *et al.*,1988;Hartwing & Phillips,1991;Hirsch,1992;Tahara & Ingham,2000)。

鉴于上述研究认识,本实验以栽培大豆作对照,对盐生野大豆的盐渍适应性与其异黄酮次生代谢的相关性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料的采集及其土壤含盐量测定

野大豆种子于2003年10月采自山东省东营市垦利县黄河入海口的盐碱滩上的野生植株,种皮为黑色,有泥膜,百粒重1.1 g,栽培大豆种子于同一季度收集于当地农家品种(非耐盐品种),经山东省农科院鉴定为惠民大豆,种皮为黄色,百粒重12.81 g。

采集野大豆时于其植株根部不同深度取土壤样品,测定土壤含盐量(中国土壤学会农业化学专业委员会,1989)。

1.2 材料的培养与处理

分别选取籽粒饱满、大小一致的盐生野大豆和栽培大豆种子,经0.1% HgCl_2 消毒10 min,自来水冲洗干净,划破野大豆种子种皮,两者皆于25℃浸种12 h,分别播种在装有沙土的大型塑料盆中,置于温室中,自然光照,昼夜温度为28和20℃,相对湿度85%,待出苗后浇以1/2浓度Hoagland培养液。

选取生长一致的野大豆和栽培大豆幼苗,分别分成4组,每组80株,每盆1株,施以不同盐浓度处理:1)对照(Hoagland培养液);2)含50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的Hoagland培养液;3)含100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的Hoagland培养液;4)含150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的

Hoagland培养液,盐处理采用浓度缓慢递增方法以避免盐冲击。经长期培养,于初花期在植株相同部位选定刚长成的叶片做标记,至叶片展开21 d时同时取下测定有关指标,根部也在同期取样分析有关指标,种子成熟后取种子测定有关指标。每个样品至少3个重复。

1.3 大豆异黄酮含量测定

参照了何继春和卫巍(2001)的4种标样快速测定法及郝征红等(2003)的方法,稍做改动。标准曲线制备:分别将大豆苷元(De)、染料木苷元(Ge)、大豆苷(D)、染料木苷(G)用80%甲醇溶解,配制成浓度为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的标准溶液,分别吸取各标准溶液10 μl 进样,测定出峰面积,从而制作出4种标样的标准曲线。

样品制备:种子样品均匀粉碎,准确称取200 mg粉样,置于10 ml容量瓶中,加入80%甲醇,定容至10 ml,新鲜叶片、根部样品取下迅速称取鲜重,按400 μl 每100 mg鲜重比例加入80%甲醇于研钵中匀浆,移入10 ml容量瓶中,定容至10 ml。然后,两样品皆在室温下超声振荡提取0.5 h,13 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,将上清液于4℃下保存待测。

色谱条件:色谱柱为Mightysil C_{18} 反相柱(4.6 $\times$ 250 mm,5 μm),流动相为甲醇:水(含0.3%磷酸)=48:52(v/v),流速为0.7 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为260 nm,柱温为35℃,进样量为10 μl ,样品分析时间30 min。

所用仪器:高效液相色谱仪(SHIMADZU LC-10AD),标准样:购自Sigma公司。样品根据标准样品的出峰时间定性,根据标准样品峰面积定量,含量计算,根据标准曲线将样品色谱图中De、Ge、D、G各自折算为含量 C_{De} 、 C_{Ge} 、 C_{D} 、 C_{G} 后按下式计算总含量:

$$\text{总异黄酮含量}(\%) = \frac{(C_{\text{De}} + C_{\text{Ge}} + C_{\text{D}} + C_{\text{G}}) \times 10}{W}$$

(W为样品称样量,mg)

1.4 苯丙氨酸裂解酶酶活性测定

苯丙氨酸裂解酶酶活性采用分光光度分析法测定,参照Ke和Saltveit(1986)及Havir(1987)的方法并作改动。取待测的大豆植株的相同部位的叶片鲜重2 g,加8 ml硼酸缓冲液(50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,含5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的巯基乙醇,pH值8.5)和0.2 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)在4℃下研磨成匀浆,13 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4℃下离心20 min得粗酶液。1 ml酶液加1 ml 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-苯丙氨酸和1 ml硼酸缓冲液,总体积为3 ml。

对照不加底物,多加 1 ml 硼酸缓冲液,反应液置恒温水浴 30 ℃中保温 1 h 后,加 0.2 ml 6 mol·L⁻¹ HCl 终止反应,用紫外分光光度计在 290 nm 处测定吸光度。PAL 酶活性以桂皮酸的生成量表示(μmol t-cinnamate·h⁻¹·mg⁻¹ protein)。粗酶液经过硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-25 层析脱盐、DEAE 纤维素柱梯度洗脱等步骤得到纯化的 PAL 蛋白(Konkol & Conn, 1961),酶蛋白含量测定使用考马斯亮蓝 G250 法,用牛血清白蛋白作为标准(Bradford, 1976)。

1.5 苯丙氨酸含量的测定

参照了李兰芳等(1997)的方法稍加改动,于植株初花期选定刚形成的叶片,至叶片展开 21 d 时同时取下,立即冰冻干燥,粉碎过 20 目筛,精密称取 1 g 左右,加 80% 乙醇浸泡并超声振动,离心分离上清液,残渣再用 80% 乙醇洗 3 遍,离心,合并各次离心液于 50 ml 量瓶中,并加 80% 乙醇至刻度。取上述提取液 20 ml,于低温水浴蒸干,加蒸馏水溶解,并转移到 10 ml 量瓶中定容。取此提取液 2.5 ml,加 2.5 ml 磺基水杨酸,混匀,用 13 200 r·min⁻¹ 离心 20 min 除去蛋白。取上清液 50 μl 进样分析。

仪器及测试条件:日立 835-50 型氨基酸自动分析仪,测试条件:分离柱为 4 × 150 mm,柱温为 57 ℃,日立 2619 型树脂,茚三酮流速为 0.3 ml·min⁻¹,缓冲液流速为 0.45 ml·min⁻¹,氨基酸标准品为 5

nmol。
1.6 根部结瘤量和固氮活性的测定
在大豆初花期取样摘根瘤,去土计数称重,然后放入反应瓶,抽去 6% 的空气,注入等体积的乙炔,就地培养 1 h 后终止反应,用乙炔还原-气相色谱法测根瘤固氮酶活性(上海植物生理研究所固氮室, 1974),气相色谱仪为上分 100 型,色谱柱为 1 m 不锈钢柱,柱内载体为 GDX-502,柱温 50 ℃,载气为 N₂,氢火焰离子化检测器,检测温度为 110 ℃。计算公式如下:

固氮活性 = (K × 样品峰高(C₂H₄ mm) × 反应瓶体积(μl) ÷ 进样量(μl) × 样品乙烯峰高(C₂H₄ mm) × 个瘤反应时间(h)) × nmol C₂H₄ · 个瘤⁻¹ · h⁻¹)

1.7 统计分析

所有实验数据均通过 SAS 软件进行差异显著性统计分析。

2 实验结果

2.1 野生状态下盐生野大豆和当年同期收获的当地栽培大豆种子异黄酮总含量、百粒重及其生境土壤含盐量比较

结果显示,盐生野大豆和栽培大豆生境土壤含盐量和种子百粒重差别都很大,而它们种子的大豆异黄酮含量差别也非常明显(表 1)。

表 1 盐生野大豆和栽培大豆种子百粒重、生境土壤含盐量及其种子异黄酮总含量比较
Table 1 Comparison of weights of per 100 seeds, salt contents of soil near plant root and total isoflavones contents of seeds between wild and cultivated soybean

种类 Species	种子百粒重 Weights of 100 seeds (g)	根部土壤含盐量 Soil salt contents (%)	种子异黄酮总含量 Seeds total isoflavones contents (μg·g ⁻¹)
盐生野大豆 Wild soybean	1.15	1.13	7 065 ± 91
栽培大豆 Cultivated soybean	12.81	0.20	1 222 ± 78

2.2 盐生野大豆和栽培大豆叶片在 NaCl 处理条件下异黄酮总含量的比较

结果显示(图 1),在对照条件下,盐生野大豆和栽培大豆叶片异黄酮含量有差别,盐生野大豆含量略低,栽培大豆含量较高;在盐处理条件下,盐生野大豆在不同浓度 NaCl 处理情况下叶片异黄酮含量皆较对照升高,栽培大豆除了 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的没有下降外,100 和 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的都有大幅度的降低。这一结果说明一定浓度的 NaCl 处理可以促进盐生野大豆叶片异黄酮的合成,而较高浓度的 NaCl 处理对栽培大豆叶片异黄酮的合成有强烈抑制作用。

2.3 盐生野大豆和栽培大豆根部在 NaCl 处理条件下异黄酮总含量的比较

结果显示(图 1),在对照条件下,盐生野大豆和栽培大豆根部异黄酮含量差别不明显,在盐处理条件下,盐生野大豆根异黄酮含量皆没有下降,50 和 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的还较对照有所升高,栽培大豆根异黄酮含量则随盐处理浓度升高大幅度地降低。这一结果说明 NaCl 处理造成了盐生野大豆和栽培大豆根部异黄酮含量差异显著。

2.4 盐生野大豆和栽培大豆种子在 NaCl 处理条件下异黄酮总含量比较

结果显示(图 1),在对照条件下,盐生野大豆和

图 1 在不同盐度条件下盐生野大豆和栽培大豆的植株不同部位(叶片、根部和种子)大豆异黄酮含量的差别
Fig.1 Difference of isoflavones contents of leaves , roots and seeds between wild and ultivated soybean under different saline conditions

栽培大豆所结种子异黄酮含量有差别,前者较高,后者较低;在不同浓度盐处理条件下,盐生野大豆种子异黄酮含量皆升高,栽培大豆种子异黄酮含量除 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的没有下降,100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的大幅度下降,150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的栽培大豆受害严重,没有结种子,种子异黄酮含量标为零。这一结果进一步说明一定浓度的 NaCl 处理可以促进盐生野大豆种子异黄酮积累,但却使栽培大

豆种子异黄酮含量下降,且 NaCl 处理浓度越高,种子异黄酮含量下降越大。

2.5 盐生野大豆和栽培大豆叶片在 NaCl 处理条件下 PAL 活性的变化

结果显示(图 2),在对照条件下,盐生野大豆和栽培大豆叶片苯丙氨酸裂解酶(PAL)活性相近;在盐处理条件下,盐生野大豆叶片 PAL 活性保持高活性,但栽培大豆叶片 PAL 活性随着 NaCl 处理浓度的升高而较大幅度地下降。这一结果说明 NaCl 处理不抑制盐生野大豆 PAL 的活性,但抑制栽培大豆 PAL 的活性。

图 2 在不同盐度条件下盐生野大豆和栽培大豆植株叶片的苯丙氨酸裂解酶活性和苯丙氨酸含量的比较
Fig.2 Comparison of PAL activities and phenylalanine contents of plant leaves between wild and cultivated soybean under different saline conditions

2.6 盐生野大豆和栽培大豆叶片在 NaCl 处理条件下的苯丙氨酸含量的变化

结果显示(图 2),在对照条件下,盐生野大豆和栽培大豆叶片苯丙氨酸含量不同,栽培大豆稍高,野大豆稍低;在盐处理条件下两者表现迥异,盐生野大豆叶片苯丙氨酸含量较对照有所下降,但不同 NaCl 浓度的处理之间差异不显著,栽培大豆叶片苯丙氨酸含量却随着 NaCl 处理浓度的升高而较大幅度地升高。这一结果说明 NaCl 处理可以导致栽培大豆叶片苯丙氨酸大量积累,而盐生野大豆叶片苯丙氨酸含量在一定浓度的 NaCl 处理下不增加,反而比对照下降。

2.7 盐生野大豆和栽培大豆在 NaCl 处理条件下根

结瘤量和固氮酶活性比较

结果如表 2 所示,在 NaCl 处理条件下,栽培大豆的根结瘤量和固氮酶活性受到的影响较盐生野大豆严重得多。栽培大豆的根结瘤数、平均瘤重和固氮酶活性 3 项指标都随盐处理浓度的升高明显下降,浓度越高,较对照的差异越显著。盐生野大豆的根结

瘤数和平均瘤重的变化差异多不显著,仅 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的平均瘤重有一定程度的下降,盐生野大豆的固氮酶活性变化有起伏,50 和 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的略有升高,150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的则有了一定程度的下降。

表 2 不同 NaCl 浓度处理下盐生野大豆和栽培大豆根结瘤量和固氮酶活性比较
Table 2 Comparison of the numbers, weights and nitrogenase activities of nodulation between wild and cultivated soybean under different saline conditions

NaCl (mmol·L ⁻¹)	盐生野大豆 Wild soybean			栽培大豆 Cultivated soybean		
	平均瘤数 Nod. number per plant	平均瘤重 Nod. weight per plant	固氮酶活性 Nitrogenase activities (nmol C ₂ H ₄ ·nod ⁻¹ ·h ⁻¹)	平均瘤数 Nod. number per plant	平均瘤重 Nod. weight per plant	固氮酶活性 Nitrogenase activities (nmol C ₂ H ₄ ·nod ⁻¹ ·h ⁻¹)
0	20.5	0.282	38.7	39.2	0.345	57.96
50	21.6	0.243	49.13	32.0	0.258	22.60*
100	19.0	0.276	41.96	15.2*	0.063*	11.31*
150	20.1	0.181*	27.99*	8.2*	0.024*	9.05*

* 在表中同一列的数据中达到差异显著性水平($p \leq 0.05$, SAS 检验) Values within a column differ significantly at $p \leq 0.05$ (SAS test)

3 讨 论

3.1 盐生野大豆在盐渍条件下积累大豆异黄酮

分析上述结果可知,在野生状态下,盐生野大豆种子的大豆异黄酮含量远高于当地同期的栽培大豆品种(表 1);在可控的栽培条件下,盐生野大豆和栽培大豆的叶片、根部和种子大豆异黄酮含量比较发现,一定浓度的盐渍条件对于盐生野大豆有促进大豆异黄酮积累的作用,相反对于栽培大豆的大豆异黄酮形成却有抑制作用,尤其是在较高的盐度条件下抑制作用明显(图 1)。

大豆体内异黄酮的合成来自前体苯丙氨酸(Phenylalanine),经 PAL、香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、苯基苯乙烯酮合成酶(CHS)、苯基苯乙烯酮异构酶(CHI)、异黄酮合成酶(IFS)等酶催化合成的(Konkol & Conn, 1961; Kreuzaler & Hahlbrock, 1972; Heller & Hahlbrock, 1980; Sutfield & Wiermann, 1980; Koes *et al.*, 1994)。这些酶的含量和活性受到多种内外因素的调节,其中, PAL 是最关键调节步骤,它是一种诱导酶,已有许多研究证实低温、机械损伤、光照、病原菌感染、毒素处理和昆虫取食都可以诱导 PAL 基因的表达(Cosio *et al.*, 1985; 江昌俊和余有本, 2001)。

本实验结果显示,盐生野大豆叶片的 PAL 活性在盐渍条件下保持了高活性,而栽培大豆叶片的 PAL 活性受到的抑制作用很明显,且随处理盐度增加,抑制程度加重;同时,叶片苯丙氨酸含量的测定

结果显示,盐生野大豆叶片在不同浓度的盐处理之间苯丙氨酸含量没有明显差别,但与对照相比皆有所下降,栽培大豆叶片在盐处理条件下的苯丙氨酸含量皆较对照升高,且处理盐度越高,苯丙氨酸含量越高(图 2)。分析认为,盐生野大豆和栽培大豆叶片的苯丙氨酸含量的不同变化是由于其 PAL 活性在盐处理条件下受到不同影响的结果,极有可能是 NaCl 处理不抑制盐生野大豆 PAL 酶的活性,*L*-苯丙氨酸能不断向合成大豆异黄酮的方向转化,而 NaCl 降低栽培大豆 PAL 酶活性,从 *L*-苯丙氨酸向大豆异黄酮合成减少,且造成叶片 *L*-苯丙氨酸积累;但盐生野大豆叶片的苯丙氨酸含量在盐处理条件下比对照下降,说明苯丙氨酸的利用反而加速,但与叶片 PAL 的活性变化并不一致,可能还与其大豆异黄酮合成途径上的其它步骤加快有关,对此有待进一步研究。总之,盐处理对盐生野大豆和栽培大豆的大豆异黄酮合成途径上的第一关键步骤有不同影响,可能因此造成了它们的叶片大豆异黄酮合成速率的不同,并导致它们根部和种子等部位大豆异黄酮含量的不同,盐生野大豆能够积累较多大豆异黄酮,栽培大豆则不能(图 1)。

3.2 盐渍条件下盐生野大豆积累大豆异黄酮的生态学意义

已有研究表明,根部大豆异黄酮的存在对于豆科植物是至关重要的,因为它是根瘤菌固氮不可或缺的诱导因子(Kosslak *et al.*, 1987; Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Hartwing & Phillips, 1991; Hirsch,

1992; Tahara & Ingham, 2000)。本实验结果证明,盐生野大豆在盐处理条件下其根部的大豆异黄酮含量远高于栽培大豆(图 1)。本实验还显示,盐生野大豆和栽培大豆的根结瘤量和固氮酶活性与根部大豆异黄酮的含量是有相关性的,栽培大豆在盐处理条件下大豆异黄酮的含量随盐度升高而下降,其根瘤数、瘤重和固氮酶活性也是如此,盐生野大豆在盐处理条件下大豆异黄酮的含量变化与固氮活性的相关较复杂,较低盐度处理(50 和 100 mmol·L⁻¹ NaCl)时其大豆异黄酮的含量较对照升高,其根瘤数和瘤重虽无明显变化,但固氮酶活性随之较对照升高,在 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理时大豆异黄酮的含量与对照相近,其根瘤数与对照无明显差异,其平均瘤重和平均固氮酶活性则下降,说明较高盐度处理对盐生野大豆的固氮活性也会有影响,但与栽培大豆的根瘤数、根瘤重和根固氮酶活性相比还是相当高的(图 1 表 2)。结果说明,盐生野大豆在一定程度的盐渍条件下根部能保持高含量的大豆异黄酮,这促进了根瘤的形成以及根瘤菌固氮活性的保持甚至提高。在实验设定的盐度处理范围内,盐生野大豆种子大豆异黄酮含量总是处于较高水平,尽管在 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理时根部大豆异黄酮含量较其它低盐度处理的降低(图 1),且固氮活性也有所下降(表 2),在这一处理的盐生野大豆种子大豆异黄酮含量仍然很高,这可能是由于大豆异黄酮的合成对于固氮是必需的,但是固氮略微降低对于大豆异黄酮的合成可能无直接影响,因为大豆异黄酮是以 C、H、O 为主要结构的化合物。盐生野大豆种子积累大量大豆异黄酮可能对其子代在盐渍条件下的萌发、固氮以及生存生长以完成生活史是必要的,对此有待进一步研究。

综上所述,本实验说明野大豆能够通过其大豆异黄酮次生代谢途径来适应盐渍环境,而栽培大豆则丧失了這個能力。究其原因,可能是在大豆由野生向栽培驯化的漫长过程中,由于其生长环境优越化和人工选择的趋向性,决定植物高产等性状的基因被肯定,而决定植物抗逆性等性状的基因被忽略,使栽培大豆表现出了抗逆性的退化,这在栽培作物中是一种普遍现象,而野大豆多仍然生存在严酷的环境中,对特定环境的抗逆性得以保持甚至强化,正如盐生野大豆表现出的特殊抗盐性,很可能正是因为野大豆抗逆性的保持,与此相关的次生代谢过程如大豆异黄酮代谢异常活跃,也许这恰恰造就了野大豆极高的药用价值,对此极有必要进行更为深入

的研究分析。

参 考 文 献

- Adesanya SA, O'Neill MJ, Roberts MF (1986). Structure related fungitoxicities of isoflavonoids. *Molecular Plant Pathology*, 29, 95 – 103.
- Agro-chemistry Specialty Committee of China Soil Academy (中国土壤学会农业化学专业委员会) (1989). *Soil Agro-chemistry General Analysis Methods* (土壤农化常规分析方法). Science Press, Beijing, 283. (in Chinese)
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 – 254.
- Caetano-Anolles, Crist-Estes GDK, Baner WD (1988). Chemotaxis of rhizobium meliloti to the plant flavone luteolin requires functional nodulation gene. *Journal of Bacterial*, 170, 3164 – 3169.
- Cosio EG, Weissinbock G, McClure W (1985). Aciflorfen-induced isoflavonoids and enzymes of their biosynthesis in mature soybean leaves. *Plant Physiology*, 18, 14 – 19.
- Du JY (杜近义), Hu GF (胡国赋), Qin JW (秦际威) (1999). Ecological significance of the secondary metabolite in plant. *Journal of Biology* (生物学杂志), 16(5), 9 – 10. (in Chinese with English abstract)
- Hao ZH (郝征红), Yue H (岳晖), Deng LG (邓立刚) (2003). Determination of soybean isoflavones by HPLC. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods* (粮油食品科技), 11(3), 6 – 7. (in Chinese with English abstract)
- Harborne JB, Ingham JL, King L, Payne M (1976). The isopen-tenyl isoflavone luteone as a pre-infectional antifungal agent in the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 15, 1485 – 1487.
- Hartmann T (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80, 177 – 188.
- Hartwing VA, Phillips DA (1991). Release and modification of mod-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiology*, 95, 804 – 807.
- Havir EA (1987). L-Phenylalanine ammonia-lyase from soybean cell suspension cultures. *Methods in Enzymology*, 142, 248 – 253.
- He JC (何继春), Wei W (卫巍) (2001). Four-samples instant determination methods of soy isoflavones. *Cereals & Oils* (粮食与油脂), (7), 46 – 47. (in Chinese)
- Heller W, Hahlbrock K (1980). Highly purified “flavanone synthase” from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 200, 617 – 619.
- Hirsch AM (1992). Tansley review No. 40. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122, 211 – 237.
- Huang TF (黄天芳) (2003). The important roles of secondary metabolites in plant survival. *Journal of Biology* (生物学杂志), 20(5), 60 – 61. (in Chinese with English abstract)
- Jiang CJ (江昌俊), Yu YB (余有本) (2001). Research progress

- in phenylalanine ammonia lyase (review). *Journal of Anhui Agricultural University* (安徽农业大学学报), 28, 425 – 430. (in Chinese)
- Ke D, Saltveit ME (1986). Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. *HortScience*, 21, 1169 – 1171.
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16, 123 – 132.
- Konkol J, Conn EE (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 2692 – 2698.
- Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common in nod genes by isoflavones isolated from glycine max. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 7428 – 7432.
- Kreuzaler F, Hahlbrock K (1972). Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants. Formation of naringenin from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS Letters*, 28, 69 – 72.
- Kutchan TM (2001). Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, 125, 58 – 60.
- Laboratory of Nitrogen Fixation of Shanghai Institute of Plant Physiology (上海植物生理研究所固氮研究室) (1974). A simplified procedure for the determination of acetylene reduction by nitrogen fixing system. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 16, 382 – 384. (in Chinese with English abstract)
- Lane GA, Biggs DR, Russell GB, Sutherland ORW, Williams EM, Maindonald JH, Donnell DJ (1985). Isoflavonoid feeding deterrents for *Costelytra zealandica*: structure-activity relationships. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 1713 – 1735.
- Li FS (李福山) (1994). Study on origin and evolution of soybean. *Soybean Science* (大豆科学), 13, 61 – 66. (in Chinese with English abstract)
- Li LF (李兰芳), Wu SX (吴树勋), Zhang K (张魁), Zhang J (张杰) (1997). Content of free amino acids in *Bothriochloa ischaemum* in different growing phases. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源), 19(3), 30 – 31. (in Chinese with English abstract)
- Long SR (1996). *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell*, 8, 1885 – 1898.
- Seigler DS (1995). *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Sutfield R, Wiermann R (1980). Chalcone synthesis with enzyme extracts from tulip anther tapetum using a biphasic enzyme assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210, 64 – 72.
- Tahara S, Ingham JL (2000). Simple flavones possessing complex biological activity. In: Atta-ur-Rahman ed. *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 22: Bioactive Natural Products (Part C)*. Elsevier, Karachi, 457 – 505.
- Wang HX (王洪新), Hu ZA (胡志昂), Zhong M (钟敏), Lu WJ (陆文静), Wei W (魏伟), Yun R (恽锐), Qian YQ (钱迎倩) (1997). Genetic differentiation and physiological adaptation of wild soybean (*Glycine soja*) populations under saline conditions: isozymatic and random amplified polymorphic DNA study. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 9, 34 – 42. (in Chinese with English abstract)
- Wang LZ (王连铮) (1985). The origin, evolution and distribution of soybean. *Soybean Science* (大豆科学), 4(1), 1 – 6. (in Chinese with English abstract)
- Wink M (1999). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (Annual Plant Reviews, Vol 2)*. Sheffield Academic Press, Sheffield, 12 – 15.
- Xu B (徐豹), Zhao SW (赵树文), Zou SH (邹淑华), Zheng HY (郑惠玉), Hu ZA (胡志昂), Wang HX (王洪新) (1985). Seed protein electrophoresis profiles of wild soybean (*Glycine soja*) in China: the frequencies and geographical distribution of Ti and Spi allele and the hypothesis on the original area of soybean. *Soybean Science* (大豆科学), 4(1), 7 – 13. (in Chinese with English abstract)
- Xu B (徐豹), Zheng HY (郑惠玉), Lu QH (路琴华), Zhao SW (赵述文), Zou SH (邹淑华), Hu ZA (胡志昂) (1986). Three new evidence of the original area of soybean. *Soybean Science* (大豆科学), 5(2), 123 – 130. (in Chinese with English abstract)
- Yan XF (阎秀峰) (2001). Ecology of plant secondary metabolism. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), 25, 639 – 640. (in Chinese with English abstract)
- Zhou S, Zhao KF (2003). Discussion on the problem of salt gland of *Glycine soja*. *Acta Botanica Sinica*, 45, 574 – 580.