

# 大豆胞囊线虫3号生理小种胁迫下不同抗性大豆品种的生化响应

李海燕<sup>1,2</sup>, 段玉玺<sup>1</sup>, 陈立杰<sup>1</sup>, 陈井生<sup>1,3</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院 北方线虫研究所, 辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163316; 3. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316)

**摘要:** 为研究大豆胞囊线虫胁迫下不同大豆品种保护酶活性的变化与抗性的关系, 以五寨黑豆和合丰35两个不同抗性大豆品种为材料, 接种大豆胞囊线虫3号生理小种, 测定根内多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、超氧化物歧化酶(SOD)和 $\beta$ -1,3葡聚糖酶活性变化。结果表明: 大豆胞囊线虫胁迫下, 抗、感品种根内PPO、POD、PAL、SOD、 $\beta$ -1,3葡聚糖酶活性均明显高于对照, 但抗病品种五寨黑豆中5种酶活性增加值大于感病品种合丰35。证明大豆品种抗性与根内上述5种酶活性的变化密切相关。

**关键词:** 大豆; 大豆胞囊线虫; PPO; POD; PAL; SOD;  $\beta$ -1,3葡聚糖酶

**中图分类号:** S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0783

## Biochemical Reaction of Different Resistant Soybean Varieties to Race 3 of Soybean Cyst Nematode

LI Hai-yan<sup>1,2</sup>, DUAN Yu-xi<sup>1</sup>, CHEN Li-jie<sup>1</sup>, CHEN Jing-sheng<sup>1,3</sup>

(1. Nematology Institute of Northern China/College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Agricultural College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163316, China; 3. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163316, China)

**Abstract:** For the purpose of studying the relationship between change of protect enzyme activity and the resistance of different soybean varieties under the stress of soybean cyst nematode (SCN), Wuzhaiheidou and Hefeng 35 were inoculated by race 3 of SCN, changes of PPO, POD, PAL, SOD and  $\beta$ -1,3 glucanase activities were determined. The results showed that under the stress of SCN, PPO, POD, PAL, SOD, of the two varieties were all higher than those of the control, the increment activity values of the resistant variety were higher than the susceptible variety. It proved that under the stress of SCN, there was closed relationship between resistance and PAL, POD, SOD and  $\beta$ -1,3 glucanase activities of different soybean.

**Key words:** Soybean; Soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*); PPO; POD; PAL; SOD;  $\beta$ -1,3 glucanase

大豆是重要的粮食作物和油料作物,同时也是植食性蛋白的重要来源。大豆胞囊线虫病(Soybean cyst nematode, SCN)又称大豆根结线虫病、黄萎病,俗称火龙秧子,是世界大豆生产的重要病害<sup>[1]</sup>。胞囊线虫是一种定居型内寄生线虫,危害大豆根部,大豆胞囊线虫病在大豆整个生育期均可发生,严重危害全世界大豆生长,直接影响大豆的产量和品质,给生产造成巨大经济损失<sup>[1]</sup>。在我国大豆胞囊线虫病主要分布于东北和黄淮海大豆主产区。大豆受其危害后,轻者减产20%~30%,重者可达70%~80%,甚至绝产<sup>[1-2]</sup>。育种家们选育了大量的抗线虫品种防治该病,美国和巴西等国家的商业化大豆品种基本都是抗线虫品种。我国是大豆的发源地,抗大豆胞囊线虫的小黑豆资源极为丰富。全世界育成的抗大豆胞囊线虫大豆品种的抗源几乎都是直接或间接引自中国小黑豆品种。

五寨黑豆为半野生黑豆种质,是我国拥有的抗胞囊线虫的独特抗源,对大豆胞囊线虫1、2、3、4、5、和7号生理小种均表现出抗性<sup>[2-3]</sup>,是中国小黑豆抗胞囊线虫的核心种质之一。合丰35为高感大豆胞囊线虫品种,是黑龙江省东部大豆产区的主栽品种。本文以五寨黑豆和合丰35为试验材料,人工接种大豆胞囊线虫,旨在通过测定抗、感大豆品种根内防御酶系的活性动态变化,揭示不同抗性品种抗大豆胞囊线虫3号生理小种的生化机制,为合理利用抗源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试大豆 五寨黑豆为SCN3号小种抗病品种;合丰35为SCN3号小种感病品种;均由黑龙江八一农垦大学农学院植保系提供。

收稿日期:2014-01-28

基金项目:农业部公益性行业科研专项(201103018,200903040-03);国家自然科学基金(31171823);现代农业产业技术体系(CARS-04-PS13)。

第一作者简介:李海燕(1966-),女,博士,教授,主要从事植物线虫学教学研究。E-mail:byndlihy@126.com。

通讯作者:段玉玺(1964-),男,教授,博导,主要从事植物病理学和植物线虫学教学和科研。E-mail:duanyx6407@163.com。

1.1.2 大豆胞囊线虫孢囊的获得 大豆胞囊线虫采自黑龙江八一农垦大学大豆胞囊线虫试验地繁殖圃,该地长期感染 SCN3,采用改良淘洗-过筛法分离孢囊,在体视解剖镜下挑出新鲜饱满成熟的孢囊。消毒干燥后 4℃ 冰箱保存备用。

1.1.3 大豆胞囊线虫卵悬液的制备 将饱满的孢囊放入组织破碎器中,用组织破碎器芯轻轻扭动 1~2 次后,用吸管加入 5~10 mL 自来水,把孢囊碎皮及卵洗入烧杯内,然后倒入 200 目和 500 目筛子组,用自来水轻轻洗下 200 目筛子上的卵,收集 500 目筛子内的卵于烧杯内,制成浓度约为 2 000 卵·mL<sup>-1</sup> 的卵悬液<sup>[4]</sup>。

1.1.4 大豆胞囊线虫的接种 将供试大豆种子用湿润的医用纱布包裹,置于培养皿中,25℃ 条件下催芽,期间及时换水。催芽后将种子移栽至装有经过高温灭菌的砂土混合物(体积比 1:2)的塑料盆中(16 cm×21 cm)。在大豆苗期接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种的卵悬液,每株约 2 000 粒卵,以不接种线虫作对照,置于温室内培养,定期定量浇水。

1.1.5 大豆根系的获得 分别于接种线虫后 6, 12, 18, 24, 30, 36 d 取接种和未接种的抗病、感病植株的根系,每个品种每次随机取 3 株,用清水冲洗干净后,放在滤纸上吸干水分, -20℃ 保存备用。

## 1.2 试验方法

提取缓冲液为 0.2 mol·L<sup>-1</sup> pH8.8 硼酸缓冲液(内含 5 mmol·L<sup>-1</sup> 巯基乙醇、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、聚乙烯吡咯烷酮 PVP 少许)制备酶粗提液。参照 Morschbacher 等<sup>[5]</sup>的方法提取。准确称取 1.0 g 大豆根系样品,放入预冷的研钵中,加入 1.5 mL 提取缓冲液和少量石英砂,在冰浴中充分研磨成匀浆,转移至离心管中,再用 1.5 mL 上述提取缓冲液冲洗研钵,将冲洗液也转入离心管中。搅动 5 min 后,10 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃ 离心 20 min,上清液即为酶粗提液。将酶粗提液放入冰箱中(-20℃)保存,用于酶活测定。多酚氧化酶(PPO)活性的测定参照李靖等<sup>[6]</sup>的方法;过氧化物酶(POD)活性的测定参照 Coell 等<sup>[7]</sup>的方法;苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性和 β-1,3 葡聚糖活性的测定参照高俊凤<sup>[8]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同抗性大豆品种接种后根内 PPO 活性变化

如图 1 所示,抗、感品种在接种大豆胞囊线虫后,根内 PPO 活性均高于未接种对照。五寨黑豆接种后酶活性变化与对照变化趋势相似,在接种后 18 d 和 30 d 出现 2 个高峰,PPO 活性分别是未接种对照的 1.40 和 1.37 倍。合丰 35 接种后酶活性变化与未接种对照差异较小,酶活性变化较慢,接种

后 24 d 出现高峰,其酶活性是未接种对照的 1.32 倍。接种大豆胞囊线虫后,抗病品种 PPO 活性变化明显大于感病品种。

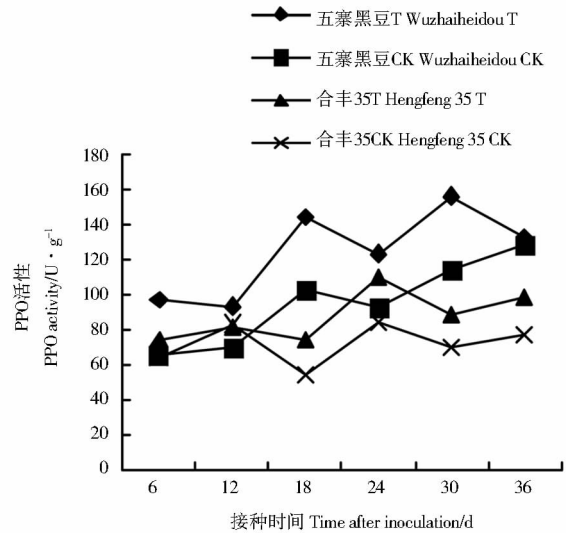


图 1 不同抗性大豆品种接种后根内 PPO 活性变化

Fig. 1 Changes of PPO in roots of resistant and susceptible cultivars infected by SCN3

### 2.2 不同抗性大豆品种接种后根内 POD 活性变化

如图 2 所示,接种大豆胞囊线虫后,抗病品种五寨黑豆和感病品种合丰 35 根内 POD 活性均高于未接种对照。合丰 35 在接种后酶活变化与对照呈相同趋势,在接种后 24 d, POD 活性出现高峰,达到 126.8 U·g<sup>-1</sup> FW。而五寨黑豆在接种后 12~24 d 时酶活性与未接种对照差异较大,接种后 12~18 d,酶活性呈上升趋势,18 d 时达到高峰,酶活性为 168.6 U·g<sup>-1</sup> FW。之后呈下降趋势,从图 2 还可以看出,在大豆胞囊线虫为害早期,抗性品种 POD 活性明显

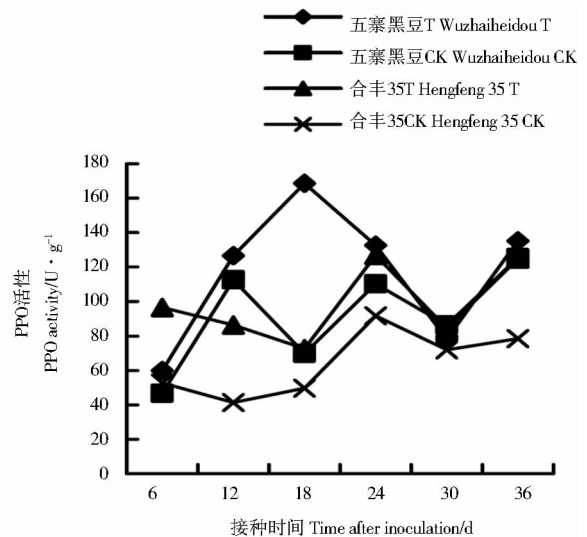


图 2 不同抗性大豆品种接种后根内 POD 活性变化

Fig. 2 Changes of POD in roots of resistant and susceptible cultivars infected by SCN3

高于感病品种,接种后 12 和 18 d,五寨黑豆的酶活性是合丰 35 的 1.46 和 2.32 倍。接种后 24~30 d 酶活性差异不大。大豆在不同时间 POD 活性变化的不同,可能是由于控制抗病性的基因表达速度,程度以及诱导所产生的具有抗性的物质活性不同所致。

### 2.3 不同抗性大豆品种接种后根内 PAL 活性变化

如图 3 所示,不论抗、感品种,接种大豆胞囊线虫后,其 PAL 酶活性均比高于对照。接种后 6 d,抗病品种和感病品种的差异不显著。之后,抗病品种五寨黑豆 PAL 活性迅速升高,接种后 18 d,达到高峰,酶活性为  $43.26 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,之后缓慢下降,但始终高于未接种对照;感病品种合丰 35 在接种大豆胞囊线虫后,酶活性增加缓慢,接种后 24 d 达到高峰,酶活性为  $29.34 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,但仍低于此时五寨黑豆的酶活性  $3.2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ 。抗病品种接种后 PAL 酶活性始终高于感病品种,接种后 12 d,抗、感品种的酶活性差异显著,五寨黑豆活性是合丰 35 的 2.25 倍。

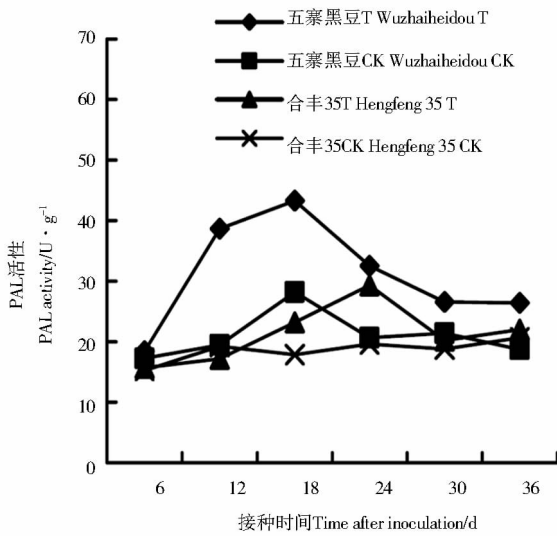


图 3 不同抗性大豆品种接种后根内 PAL 活性变化

Fig. 3 Changes of PAL in roots of resistant and susceptible cultivars infected by SCN3

### 2.4 不同抗性大豆品种接种后根内 SOD 活性变化

如图 4 所示,随着植株的生长,2 品种未接种对照的 SOD 活性都呈缓慢上升趋势,感病品种合丰 35 在接种大豆胞囊线虫后, SOD 活性比对照明显增加,接种 30 d 达到高峰,酶活性为  $67.4 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,是不接种对照的 1.26 倍。抗病品种五寨黑豆在接种大豆胞囊线虫后, SOD 活性出现 2 个高峰。接种 18 d,达到第 1 个高峰,酶活性为  $67.4 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,是不接种对照的 1.71 倍,比接种 18 d 的合丰 35 增加  $19.8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ 。接种 36 d,达到第 2 个高峰,酶活性为  $61.8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,与此时接种后的合丰 35 的酶活性  $60.3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$  差异不显著。

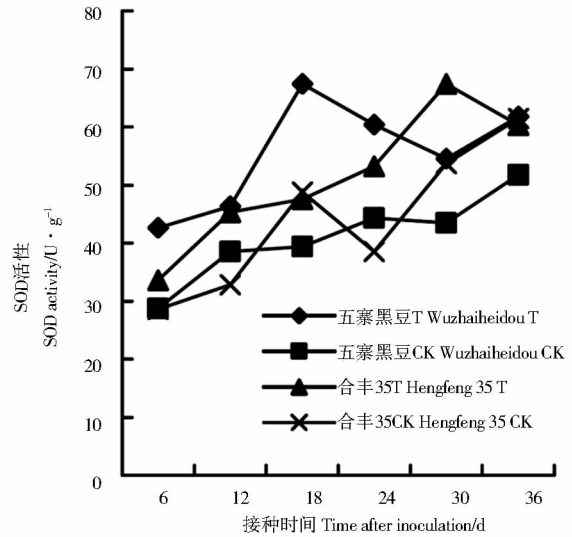


图 4 不同抗性大豆品种接种后根内 SOD 活性变化

Fig. 4 Changes of SOD in roots of resistant and susceptible cultivars infected by SCN3

### 2.5 不同抗性大豆品种接种后根内 β-1,3 葡聚糖酶活性变化

如图 5 所示,抗病品种五寨黑豆在接种后出现酶活性升高-降低-升高趋势。接种 12 和 30 d,根内 β-1,3 葡聚糖酶活性明显高于对照,酶活性比未接种对照分别增加 4.2 和  $8.49 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ,其他时间与对照差异不显著;合丰 35 接种大豆胞囊线虫后,β-1,3 葡聚糖酶活性变化趋势与抗病品种接种后的变化趋势相似,接种后明显高于未接种对照。接种后 12 和 30 d,出现 2 个峰值,其酶活比未接种增加 11.8 和  $10.2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。抗病品种的酶活在接种后 6 和 30 d 与感病品种差异不大,其他时间差异明显。

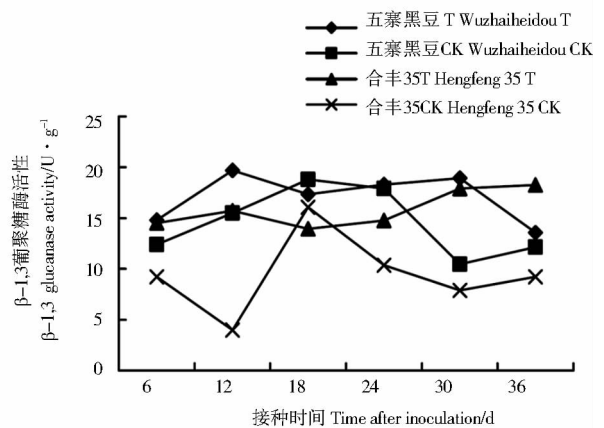


图 5 不同抗性大豆品种接种后根内 β-1,3 葡聚糖酶活性变化

Fig. 5 Changes of β-1,3 glucanase in roots of resistant and susceptible cultivars infected by SCN3

### 3 结论与讨论

大豆胞囊线虫是一种内寄生线虫,由于其生活在大豆根部和土壤中,其发生和发病都具有一定的隐蔽性。有研究报道木质素的沉积不仅能够阻止线虫的侵入,而且还能阻止营养物质向合胞体的运输。PPO 和 PAL 都是与木质素有关的关键酶类,其中 PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,它可催化 L-苯丙氨酸还原脱氨形成反式肉桂酸,再进一步形成一系列羟基化肉桂酸衍生物,为植保素及木质素等抗性物质提供苯丙烷碳骨架或碳桥,其活性与植保素和木质素等次生物质代谢有关。PPO 属于氧化酶体系,主要参与酚类氧化为醌及木质素前体的聚合作用,其活性与抗性有密切关系。从本试验的研究结果来看,接种处理后,抗病品种五寨黑豆 PPO 和 PAL 酶活较早的达到峰值,且远高于感病品种,可能是及时产生了对线虫有毒害作用的醌类和木质素等物质,达到抗病目的。

大豆胞囊线虫胁迫下会使大豆膜系统受损从而会影响植株生长,具体表现在植物细胞膜透性增加,细胞内可溶性物质大量外渗,最后引发植物代谢失调。POD(过氧化物酶)、SOD(超氧化物歧化酶)是植物膜自由基清除系统中重要的保护酶。可以保护细胞膜免受活性氧的侵害。许多研究表明大豆胞囊线虫侵入后,植株体内防御酶系发生不同程度的变化,表现在抗病品种的酶活性高于感病品种<sup>[9-12]</sup>。本研究结果显示,大豆胞囊线虫胁迫下,大豆抗、感品种中膜系统的两种保护酶 POD、SOD 酶均比对照增高,且抗病品种酶活性明显高于感病品种,这与前人研究结果相似。表明不同大豆品种的抗病性与大豆胞囊线虫胁迫下大豆根内 POD、SOD 酶活力的变化密切相关。

Baldrige 等<sup>[13]</sup>报道,苜蓿遭受根结线虫侵染后,抗病品种根系  $\beta-1,3$  葡聚糖酶活性显著高于感病品种。而李海燕等<sup>[14]</sup>研究表明,大豆接种 AM 真菌,可提高根系  $\beta-1,3$  葡聚糖酶活性,增强抗大豆胞囊线虫的能力,但大豆胞囊线虫侵染未引起该酶活性发生显著变化。本研究结果显示,大豆胞囊线虫侵染可以诱导植株体内  $\beta-1,3$  葡聚糖酶活性增高,抗病品种增强的幅度大,且表达速度快。研究证明不同大豆品种的抗病性与大豆胞囊线虫胁迫下大豆根内 PAL、POD、PPO、SOD、 $\beta-1,3$  葡聚糖酶活力的变化密切相关。

### 参考文献

[1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:285-288. (Liu W Z. Plant pathogen nematology(in Chinese)[M]. Beijing: China Agriculture Press,2000:285-288.)

- [2] 大豆种质抗胞囊线虫鉴定研究协作组. 大豆种质资源对大豆胞囊线虫 1,3 和 4 号生理小种的抗性鉴定[J]. 大豆科学,1993,12(2):91-99. (Coordinative group of evaluation of SCN. Evaluation of soybean germplasm for resistance to race 1,3 and 4 of the soybean cyst nematode[J]. Soybean Science,1993,12(2):91-99.)
- [3] 段玉玺,周博,陈立杰,等. 抗大豆胞囊线虫 3 号生理小种(SCN3)核心种质代表性分析[J]. 大豆科学,2008,27(3):366-372. (Duan Y X, Zhou B, Chen L J, et al. A discussion for speeding up breeding soybean cultivars resistant to the soybean cyst nematode[J]. Soybean Science,2008,27(3):366-372.)
- [4] 刘维志. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1995. (Liu W Z. Research techniques of plant nematology[M]. Shenyang:Liaoning Science and Technology Press,1995.)
- [5] Moerschbacher B. Libnin biosynthesis and the resistance of wheat to stem rust[J]. Phytoparasitica,1988,16(2):197-198.
- [6] 李靖,利容千,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报,1991,21(4):277-282. (Li J, Li R Q, Yuan W J. On the change of enzyme activities of cucumber leaf infected by *Pseudoperonospora Cubensis* (Bere. Et Ctrt) roswws[J]. Plant Phytopathologica Sinica,1991,21(4):277-282.)
- [7] Goell A, Goel A K, Sheoran I S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L. seeds) [J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(9):1093-1100.
- [8] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2006:211-213,219-220. (Gao J F. Plant physiological experiment[M]. Beijing:Higher Education Press,2006:211-213,219-220.)
- [9] 吴海燕. 大豆与大豆胞囊线虫相互关系研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2003. (Wu H Y. The interaction of resistant soybeans and *Heterodera glycines*[D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2003.)
- [10] 刘大伟,段玉玺,陈立杰,等. 灰皮支黑豆抗大豆胞囊线虫 3 号生理小种的生化机制研究[J]. 华北农学报,2009,24(1):165-168. (Liu D W, Duan Y X, Chen L J, et al. Study on biochemical mechanism of Huipizhi Heidou resistant to race 3 of soybean cyst nematode[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2009,24(1):165-168.)
- [11] 罗璇,段玉玺,陈立杰,等. 大豆胞囊线虫不同生理小种对大豆根内酶活力的影响[J]. 大豆科学,2010,29(3):448-452. (Luo X, Duan Y X, Chen L J, et al. Effect of different races of soybean cyst nematology on the activities of the enzymes in roots of soybean[J]. Soybean Science,2010,29(3):448-452.)
- [12] 张海平,王志,李原萍. 灰皮支黑豆抗大豆胞囊线虫 4 号生理小种的生化机制研究[J]. 大豆科学,2012,31(5):796-800. (Zhang H P, Wang Z, Li Y P. Biochemical mechanism of Xingxianhuipizhi resistant to race 4 of soybean cyst nematode[J]. Soybean Science,2012,31(5):796-800.)
- [13] Baldrige G D, O'Neill N R, Samac D A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root lesion nematode, *pratylenchus penetrans*: Defense response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots[J]. Plant Molecular Biology,1998,38(6):999-1010.
- [14] 李海燕,刘润进,李艳杰. AM 真菌和胞囊线虫对大豆根内酶活性的影响[J]. 菌物系统,2003,22(4):613-619. (Li H Y, Liu R J, Li Y J. Influence of arbuscular mycorrhized fungi and heterodera glyaines on enzyme activity in soybean roots[J]. Mycosystema,2003,22(4):613-619.)