

蚜虫侵害对不同基因型大豆酶活性及次生代谢物含量的影响

姜伊娜,王彪,武天龙

(上海交通大学农业与生物学院,上海 200240)

摘要:对大豆抗蚜品系 P746 和感蚜品系交大 02-89 蚜虫侵害后的过氧化物酶(POD)、过氧化物酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)3种酶活性及相关次生代谢物质含量变化与抗蚜性进行相关性分析。结果表明:蚜虫侵害后不同品系之间 POD、PPO 活性均有升高,与蚜虫的诱导存在相关性,但与抗性基因型不存在显著关联。PAL 活性蚜虫侵害前抗虫的 P746 具有高水平表达,并与感蚜品系存在显著差异;蚜虫侵害诱导后 PAL 酶活性均有上升,抗蚜品系表现稳定,表明 PAL 酶活性与大豆的抗蚜性存在明显的相关性。HPLC 分析表明蚜虫侵害前后大豆叶片组织内氨基酸、黄酮类物质、生物碱类、酚类等次生代谢产物的含量都发生了明显变化,并且在不同蚜虫侵害时间和抗性基因型之间存在明显差异,表明这类物质与大豆抗蚜性有很大关联。

关键词:大豆蚜虫;过氧化物酶;多酚氧化酶;苯丙氨酸解氨酶;次生代谢产物

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)01-0103-05

Response of Enzyme Activity and Secondary Metabolites of Different Soybean Genotypes to *Aphis glycines* Matsumura Invasion

JIANG Yi-na, WANG Biao, WU Tian-long

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In this experiment we examined two soybean varieties including P746 with resistance to aphid and Jiaoda 02-89 with susceptibility to aphid to study the mechanism of the aphid resistance through the analysis of the enzymatic activity of Peroxidase(POD), Polyphenol Oxidase(PPO), Phenylalanine Ammonia-lyase(PAL) and the content of secondary metabolites. The results showed that the enzyme activity of PPO and POD expressed at higher level in each variety after infected by aphid, but there was no obvious difference between resistance and susceptible materials. The PAL enzyme activity was different between resistance and susceptible materials, it was higher in the resistance material than that of susceptible one before aphid infected. The activity expressed at higher level after induced by aphid, but the change in the resistance materials was not obvious. Besides, we analyzed the changes of the secondary metabolites infected by soybean aphids using HPLC methods, the result indicated that the content of some secondary metabolites in leaf tissue such as amino acid, flavonoid, alkaloid, phenol increased after infected by aphid, and the changes between the two materials were obvious too, which demonstrate that the aphid resistance of soybean might rely on these substances.

Key words: Soybean aphid; POD; PPO; PAL; Secondary metabolites

大豆蚜虫(*Aphis glycines* Matsumura)是大豆苗期的主要害虫之一,俗称“腻虫”,属同翅目蚜虫科。感染后不但直接严重危害大豆,还通过传播多种病毒病造成间接危害,严重影响植株正常的生长发育,导致植株矮化,茎叶枯萎、影响大豆正常开花和结实,最后导致植株死亡。近年来随着气候变暖的趋势加剧,大豆蚜虫灾害发生的频率增加^[1]。在我国

大豆蚜虫已经成为大豆生产的主要虫害^[2]。2000年以前大豆蚜虫危害主要发生在中国、菲律宾、泰国、朝鲜、韩国、印尼和俄罗斯等国家,最近几年先后侵入美国、加拿大和澳大利亚。大豆蚜已成为广泛关注的重要世界性农业害虫^[3-5]。选育和利用抗蚜或耐蚜的大豆品种是生产上迫切需要解决的问题。

当植物受到侵害时,植物细胞中控制物质代谢

收稿日期:2008-11-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871549);上海市科委基础研究重点资助项目(08JC1410500)。

作者简介:姜伊娜(1983-),女,博士研究生,研究方向大豆遗传育种。E-mail:yinajiang@sjtu.edu.cn。

通讯作者:武天龙,教授,博士生导师,研究方向豆类遗传育种。E-mail:tianlongwu@263.net。

的酶首先做出反应,尤其是一些次生代谢物质形成过程中的关键酶类会很快执行保护性反应。研究表明 POD、PPO、PAL 是植物次生代谢过程的 3 个关键酶,与植物的抗病虫能力紧密相关^[6]。庄炳昌等^[7]在对大豆内生物活性物质、酶活性与大豆抗食心虫病的研究中发现,类黄酮、酚类等次生代谢物以及多酚氧化酶(POD)活性与大豆的抗虫性有一定的关联。以抗蚜性状不同的两个大豆品种为材料,对感蚜前后 3 种酶的活性及相关次生代谢物含量变化进行了测定分析,为大豆抗感蚜的鉴定进一步提供了依据,并对 3 种酶与抗蚜虫之间相关性进行了分析,为深入研究大豆抗蚜性机理和品种选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 材料 大豆抗蚜材料 P746、感蚜材料交大 02-89 于 2008 年 4 月在上海交通大学试验田种植,每材料按 3 行区种植,自然感蚜。分别于 2008 年 5 月 25 日未发生蚜虫时和 6 月 8 日蚜虫发生 7 d 左右取材,选取整齐一致的生长植株叶片,混合取样。

1.1.2 仪器与试剂 高效液相色谱仪:Agilent 1100(美国 Agilent Int.),色谱柱:Venusil MP-C18 (2.1×150 mm,5 μm;Agela Technologies Inc.),分光光度计:8500 UV-VIS(上海天美科学仪器有限公司),乙晴、甲醇(HPLC 专用色谱纯试剂),超纯水,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶的提取与测定

1.2.1.1 过氧化物酶(POD)的测定 测定参照 Hammerschmidt 的愈创木酚法^[8]进行:取 1 g 材料液氮研磨,加入 6 mL 预冷的 POD 提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液,内含 15 mmol 巯基乙醇,1 mmol EDTA,和少许 PVP,pH 6.0),涡旋 5 min 后以 15 000 r·min⁻¹、4℃条件下离心 15 min,收集上清液进行过氧化物酶活性测定。取 1 mL 酶提取液,与 2 mL 10 mmol·L⁻¹的磷酸缓冲液,1 mL 0.25% 愈创木酚,1 mL 0.1 mol·L⁻¹的 H₂O₂,在室温下反应 2 min 后测定 470 nm 吸光值。加入 4 mL 的 10 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液代替底物(愈创木酚和 H₂O₂)与上述酶液进行反应作为对照。3 次重复。

1.2.1.2 多酚氧化酶(PPO)的测定 参照王冬梅等^[9]的方法:取 1 g 新鲜叶片,液氮研磨,稍放置后加 Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液 10 mL,再冰浴继续研磨至匀浆,在 4℃下以 9 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上述酶液 1 mL,加 3 mL 0.2 mol·L⁻¹的邻苯二酚(用 pH 8.0 磷酸缓冲液配制),于 30℃水浴中保温 30 min,而后用 0.5 mL 的 10% 磷酸终止反应,取上清测其在 495 nm 处的吸光度值。取等量的 pH 8.0 的磷酸缓冲液代替底物(邻苯二酚)与上述酶液进行反应作为对照。3 次重复。

1.2.1.3 苯丙氨酸氧化酶(PAL)的测定 参照 Koukol 的方法^[10]测定:取 1 g 材料,液氮研磨后加入 6 mL 预冷的 PAL 提取缓冲液(0.2 mol·L⁻¹硼砂缓冲液,内含 5 mmol 的巯基乙醇,1 mmol EDTA,1 mmol PVP,pH 8.8),匀浆涡旋 5 min 后以 12 000 r·min⁻¹、4℃条件下离心 20 min,收集上清液进行酶活性测定。取 1 mL 酶提取液,加入 2 mL 0.2 mol·L⁻¹ pH 8.8 硼砂缓冲液,1 mL 20 mmol·L⁻¹苯丙氨酸和 1 mL,在 37℃水浴条件下反应 1 h 后 290 nm 处测定吸光值。加入 3 mL pH 8.8 的硼砂缓冲液代替底物(苯丙氨酸)与上述酶液进行反应作为对照。3 次重复。

1.2.2 次生代谢物质的提取与测定 称取 1 g 的新鲜组织样品加入 6 mL 80% 的甲醇水溶液,过夜。超声波仪(100 W)超声 1 h,12 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液放入 25 mL 容量瓶中。重复 2 次,最后定容至 25 mL。进行高效液相色谱分析以前,使用 0.45 μm 的滤膜过滤。

流动相:乙晴(A),淋洗:pH = 3 超纯水(B)。检验波长:236 nm,柱温:25℃,流速:0.2 mL·min⁻¹,进样量:10 μL。线性梯度洗脱程序:0~30 min,A% 0-55/B% 100-45;30~40 min,A% 100/B% 0;40~60 min,A% 0/B% 100。

2 结果与分析

2.1 抗性相关酶活性分析

分析两品系蚜虫侵害前后叶片 POD、PPO 和 PAL 酶活性的变化,结果表明(图 1),蚜虫侵害后各品系 POD、PPO 和 PAL 酶活性均有所上升,但不同品系间侵害前后 3 种酶活性及其变化幅度均有所差异。

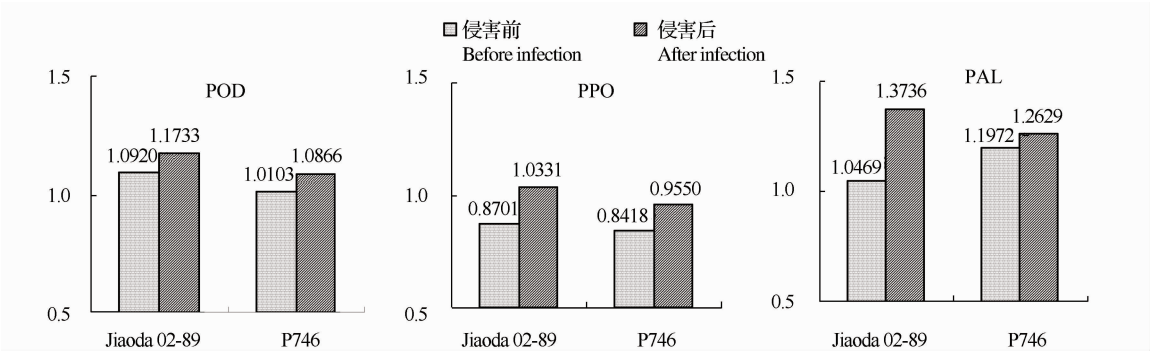


图 1 蚜虫侵害前后不同基因型大豆酶活性变化

Fig. 1 Changes of enzyme activity of POD, PPO and PAL after aphid infection/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

表 1 蚜虫侵害前后不同基因型大豆酶活性
种内变化显著性比较

Table 1 Significance analysis of enzyme activity
after infection within a variety

酶 Enzyme	侵害情况 Aphid infection	交大 02-89 Jiaoda 02-89		P746	
POD	前 Before	B	b	B	b
	后 After	A	a	A	a
PPO	前 Before	B	b	B	b
	后 After	A	a	A	a
PAL	前 Before	B	b	A	a
	后 After	A	a	A	a

同列数据后不同大、小写字母分别表示在 0.01 或 0.05 水平上的差异显著。下同。

Values follows by a different small or capital letter within a column are significantly different at the 0.05 or 0.01 probability levels. The same as bellow.

表 2 蚜虫侵害前后不同基因型大豆酶活性变化
(均值)种间显著性比较

Table 2 Significance analysis of enzyme activity after
infection between varieties

酶 Enzyme	品种 Variety	均值 Average values	5% 显著水平 5% probability levels	1% 显著水平 1% probability levels
		$\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		
POD	02-89	0.0765	a	A
	P746	0.0813	a	A
PPO	02-89	0.1631	a	A
	P746	0.1132	a	A
PAL	02-89	0.3086	a	A
	P746	0.0657	b	B

分析两品系蚜虫侵害前后叶片 POD 和 PPO 酶活性的变化,结果表明:蚜虫刺激后各品系 POD、PPO 酶活性均有所上升,其中高抗蚜品种 P746 在蚜虫侵害前后 POD、PPO 酶活性均低于感性品种交大 02-89(图 1)。不同基因型大豆蚜虫侵染前后 POD、

PPO 酶活性差值的显著性分析表明(表 1、2),虽然各基因型大豆 POD、PPO 酶活性在蚜虫侵染后均表现为显著增加,但酶活性在不同抗性品种之间并不存在显著性差异,表明 POD、PPO 酶活性的变化可能与蚜虫的诱导有关,但酶活性与不同基因型大豆的抗、感蚜虫特性间无显著相关性。

大豆抗感基因型 PAL 酶变化差值比较(图 1)表明,不同基因型大豆 PAL 酶活性侵害后比侵害前有所升高,高抗蚜品种 P746 在受侵害前 PAL 酶活性高于感蚜品种 02-89,但侵害后酶活性增长幅度相对较小。感蚜品种交大 02-89 侵害后 PAL 酶活性变化显著,而高抗蚜品种 P746 中 PAL 酶活性变化水平不显著,表明在抗蚜品系中 PAL 酶活性维持一个较稳定的水平。但从表 2 可以看出,不同抗蚜品系间受蚜虫侵害后 PAL 酶活性变化存在显著差异。暗示 PAL 酶在抗性品种 P746 中表现为组成型表达。而在感蚜品系中酶活性显著升高,表明蚜虫的侵害可诱导 PAL 酶的增强表达,而且酶活性变化与受害程度存在正相关。因此可以推断,PAL 是引起感蚜品种和抗蚜品种之间抗蚜性不同的一种关键酶,也是大豆抵抗蚜虫侵害的一种关键酶。

2.2 次生代谢物质含量的变化

采用 HPLC 法在 236 nm 测定和对比感蚜品种 02-89、抗蚜品种 P746 受蚜虫侵害前后生物活性物质的变化。图 2 为两种大豆品种次生代谢物质 HPLC 对比图,横坐标为洗脱时间(min),纵坐标为峰值(mAU)。比较各批供试品的色谱图,确定了 17 个共有峰:2.23 min, 5.21 min, 10.24 min, 13.75 min, 15.78 min, 18.46 min, 19.28 min, 19.84 min, 20.23 min, 21.51 min, 22.01 min, 23.54 min, 24.66 min, 26.67 min, 27.68 min, 28.18 min, 29.59 min。

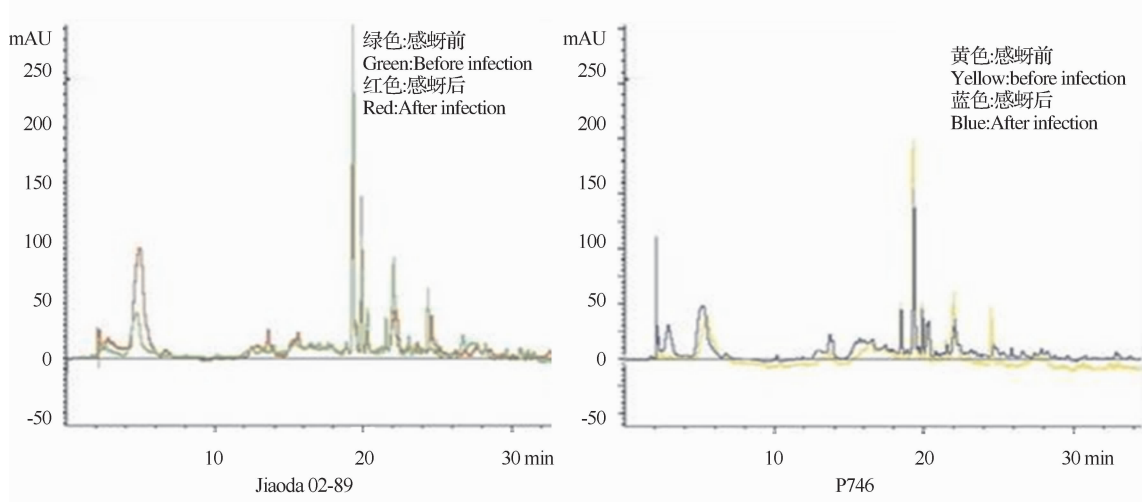


图2 不同大豆品种次生代谢物质 HPLC 对比

Fig.2 HPLC comparison of secondary metabolites between two varieties of soybean

在对同条件下感、抗蚜品种次生代谢物质变化情况的比较发现:侵害前后不同感蚜品种中次生代谢物质含量发生了很大的改变,有些甚至达到了倍性变化(如表3),例如感蚜品种 P746 中 2、4、9、11、12、14 号峰;抗蚜品种 02-89 中 1、11、12、13 号峰。其中 11、12 号峰变化相似。分析表明,这些物质多为苯丙氨酸代谢途径的相关物质,如:黄酮类、生物碱类、酚类等。这与感、抗蚜品种中 PAL 酶含量的变化相对应,即在感蚜品种中的变化很显著,而在抗蚜品种中的变化不显著,处于一个比较平缓的变化

表3 不同基因型大豆感蚜前后次生代谢物质变化比较(mAU)

Table 3 Significantly differences between two varieties of secondary metabolites(mAU)					
序号 Number	出峰时间 Retention Time/min	交大 02-89 Jiaoda 02-89		P746	
		侵害前 Before	侵害后 After	侵害前 Before	侵害后 After
1	2.23	11.4	23.0	11.5	57.2
2	5.21	42.2	99.5	38.7	49.2
3	10.24	3.6	2.7	5.6	4.0
4	13.75	6.1	24.6	9.3	22.7
5	15.78	15.5	21.5	2.4	19.2
6	18.46	4.5	5.8	51.4	43.7
7	19.28	273.6	259.8	186.2	153.9
8	19.84	87.1	115.3	33.3	40.8
9	20.23	36.6	15.5	39.9	29.3
10	21.51	25.5	19.1	16.8	7.3
11	22.01	90.8	34.6	60.8	36.5
12	23.54	2.4	13.1	-2.5	2.6
13	24.66	11.2	35.5	44.2	10.5
14	27.68	4.0	9.3	8.6	9.3
15	28.18	9.8	8.9	7.2	3.2

中,例如抗蚜品种中 2、4、6、12、13、14 号峰。由此可以推断,这些变化的次生代谢物质与大豆的抗蚜性存在很大的关联性。

3 讨论

大豆蚜虫通常在侵染植株 10 至 15 d 时种群数量达到峰值,并维持至植株开花时期^[11],试验在 15 d 内(约 2 个蚜虫繁殖周期)进行结果鉴定,保证了试验的准确性。在测定不同品种大豆感蚜前后叶片组织中次生代谢物质变化时主要参考了 Terrence L. Graham^[12]的方法,提取时使用 80% 的甲醇溶液,方便易操作且杂质影响较小。根据供试品的紫外图谱,分别在 236、260、280 nm 处进行检测,并且对色谱柱及流动相梯度的选择进行大量对比。结果表明,使用本条件进行 HPLC 测定时,各色谱峰之间分离度好,共有峰多,基线平稳,各峰分布也相对合理。

过氧化物酶(POD)是普遍存在于植物组织中的一种氧化还原酶,以 H₂O₂ 作为电子受体,氧化各种次生代谢过程中的物质,不同外界条件均可诱导其活性及其同工酶发生变化,已被广泛用于植物的抗性研究。多酚氧化酶(PPO)是一类广泛分布于植物体内能催化多酚类氧化成醌类的质体金属酶,能直接以 O₂ 为氧化底物将酚氧化成醌,以抑制病虫害的侵染。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植保素、木质素和酚类化合物合成的关键酶和限速酶。当植物被诱导后苯丙氨酸解氨酶活性明显增强,与木质素含量增加趋势相吻合,并与系统获得抗性表达存在相关性。

通过对不同基因型大豆受蚜虫侵害胁迫前后 3

种酶活性变化的分析可证实 POD、PPO 和 PAL 等酶是植物次生代谢过程中的 3 个关键酶。3 种酶活性在蚜虫侵害后有明显的升高充分证实 3 种酶在植株组织和细胞遭受侵害时会产生诱导机制来抵御昆虫的取食。但 POD、PPO 和 PAL 3 种酶活性在抗感基因型之间存在明显差异,POD、PPO 酶活性在侵害前后抗蚜基因型表现为相对较低的水平,虽然侵害后各基因型大豆 POD、PPO 酶活性均表现为显著增加,但两品种之间不存在显著性差异,表明 POD、PPO 酶活性与蚜虫的诱导存在相关性,但在抗感材料间不存在趋势性变化。而 PAL 酶活性在侵害后也均有增加,抗蚜品种中变化幅度不大且始终保持稳定的较高水平表达,表明 PAL 酶活性与大豆的抗蚜性存在相关性。

昆虫对寄主植物的选择与植物所含营养成分及次生代谢物质种类有关。但是,对昆虫的取食性产生决定性影响的是植物含有种类繁多的次生代谢产物^[13]。通过对叶片中次生代谢物质含量的分析表明,感蚜前后不同基因型大豆确实存在很多次生代谢物质的变化,通过与 3 种酶活性变化分析相比较,可以初步判断这些物质应该是与苯丙氨酸代谢途径相关的物质。现已知道,许多次生代谢产物有防御昆虫取食或毒杀昆虫的作用,如植物体内产生的萜类、生物碱、香豆素、黄酮、醌类、酚类、糖苷类、甾醇,以及一些动物和微生物体内产生的毒素等等^[14]。对实验中出现的一些有显著变化的物质的进一步分离与鉴定将有助于大豆抗蚜性资源的鉴定与抗蚜育种的相关研究。

参考文献

- [1] 王春荣,邓秀成,殷丽娟,等. 2004 年黑龙江省大豆蚜虫暴发因素分析[J]. 大豆通报,2005(3):19-20. (Wang R C, Deng X C, Yin L J, et al. Analysis of soybean aphids outbreak in Heilongjiang 2004[J]. Soybean Bulletin, 2005(3):19-20.)
- [2] 郑永利,姚士桐. 鲜食大豆蚜虫种群增长规律与防治指标[J]. 昆虫知识,2006,43(3):395-397. (Zheng Y L, Yao S T. Occurrence regularity and control threshold of Aphis glycines in fresh soybean fields[J]. Entomological Knowledge, 2006, 43(3):395-397.)
- [3] 苗进,吴孔明,李国勋. 大豆蚜的研究进展[J]. 大豆科学,2005,24(2):135-138. (Miao J, Wu K M, Li G X. Progress of soybean aphids study[J]. Soybean Science, 2005, 24(2):135-138.)
- [4] Hill C B, Li Y, Hartman G L. A single dominant gene for resistance to the soybean aphid in the soybean cultivar dowing[J]. Crop Science, 2006, 46(4):1601-1605.
- [5] Hill C B, Li Y, Hartman G L. Soybean aphid resistance in soybean Jackson is controlled by a single dominant gene[J]. Crop Science, 2006, 46(4):1606-1608.
- [6] 张丽,常金华,罗耀武. 不同高粱基因型感蚜虫前后 POD、PPO、PAL 酶活性变化分析[J]. 农业生物技术科学,2005,21(7):40-42. (Zhang L, Chang J H, Luo Y W. Activity changes of POD, PPO, PAL of the different sorghum genotypes invaded by Aphis glycines. Zehntner[J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2005, 21(7):40-42.)
- [7] 庄炳昌,岳德荣,王玉民,等. 大豆不同品种次生代谢产物及相关酶类含量与抗食心虫的关系[J]. 中国油料作物学报,1993(3):18-20. (Zhuang B C, Yue D R, Wang Y M, et al. The correlation of content of flavonoid, total phenolate and enzymes in soybean with resistance level to L. glycivorella[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1993(3):18-20.)
- [8] 王冬梅,王智忻,杨秀屏,等. 已知 Lr 基因小麦在叶锈菌侵染过程中 PO 活性及其同工酶的变化[J]. 河北农业大学学报,1994,17(1):1-6. (Wang D M, Wang Z X, Yang X P, et al. Changes of peroxidase activity and isozymes in the course of leaf rust infection of wheat lines with known Lr[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 1994, 17(1):1-6.)
- [9] Carpita N, McCann M. The cell wall[M]//Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, 2000:52-108.
- [10] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare[J]. Journal of Biology Chemistry, 1961, 236:2692-2698.
- [11] 林存奎,寻振山,李令堂,等. 豆田蚜虫防治指标的研究[J]. 大豆科学. 1992,11(4):318-321. (Lin C L, Xun Z S, Li L T, et al. Study of the control threshold of aphid in soybean field[J]. Soybean Science, 1992, 11(4):318-321.)
- [12] Terrence L Graham. A rapid high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites[J]. Plant Physiology, 1991, 95:584-593.
- [13] 孙海燕,罗兵,喻德跃. 次生代谢抗虫基因工程研究进展[J]. 安徽农业科学,2005,33(8):1906-1907. (Sun H Y, Luo B, Yu D Y. Study on secondary metabolism genetic engineering about insect resistance[J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2005, 33(8):1906-1907.)
- [14] 杨致荣,毛雪,李润植. 植物次生代谢基因工程研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报,2005,31(1):11-18. (Yang Z R, Mao X, Li R Z. Research progress in genetic engineering of plant secondary metabolism[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(1):11-18.)