



线虫胁迫下大豆肌醇加氧酶活力研究

王学敏¹, 王 晗¹, 王 超¹, 王 爽¹, 于佰双², 陈井生², 王 惠¹, 段玉玺³

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 为确定大豆胞囊线虫侵染大豆根部后, 肌醇加氧酶活力的变化, 以感病品种辽豆 15 和抗病品种灰皮支黑豆、哈尔滨小黑豆和小粒黑豆为试验材料, 在人工接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种后, 利用肌醇加氧酶(MIOX) 酶联免疫试剂盒检测肌醇加氧酶活力的变化情况。结果表明, 在接种后的第 5 天, 感病品种辽豆 15 酶活力达到最大值, 约为对照组的 1.61 倍。而抗病品种哈尔滨小黑豆、灰皮支黑豆和小粒黑豆分别在接种后的第 10 天、第 15 天、第 5 天肌醇加氧酶活力达到最高, 分别是对照组酶活力的 1.46, 1.51, 1.85 倍。

关键词: 大豆; 肌醇加氧酶; 大豆胞囊线虫; 酶活力

Study on Activity of Myo-inositol Oxygenase Under Stress of Nematodes

WANG Xue-min¹, WANG Han¹, WANG Chao¹, WANG Shuang¹, YU Bai-shuang², CHEN Jing-sheng², WANG Hui¹, DUAN Yu-xi³

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Liaoning 110866, China; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to determine the activity of Myo-inositol oxygenase after soybean cyst infected soybean root. A susceptible cultivar Liaodou 15 and the resistant cultivars Huipizhi heidou, Harbin Xiaoheidou and Xiaoliheidou were used inositol oxygenase (MIOX) elisa kit to detect changes of the inositol oxygenase enzyme activity from soybeans roots after SCN3 infection. The results showed that 5 d after inoculation, Liaodou15 cultivars enzyme activity reached the maximum value, which was about 1.61 times in the control group. And disease-resistant cultivars of Harbin Xiaoheidou and Xiaoliheidou and Huipizhi Heidou, in the 10, 15, 5 d after inoculation, inositol oxygenase reached the highest enzyme activity were the control enzyme activity of 1.46 times, 1.51 times, 1.85 times respectively.

Keywords: Soybean; MIOX; *Heterodera glycines*; Enzyme activity

大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines*), 简称 (SCN), 是影响大豆产量和质量的主要病原物之一, 一般会导致大豆减产 10% ~ 30%, 严重地块可减产 70% ~ 90%。甚至造成绝收^[1]。在美国、巴西、加拿大和中国等几个大豆主产国, 大豆胞囊线虫病引起的损失比任何一种单一病害所造成的损失都大^[2]。在大豆根系中, 肌醇含量的变化与大豆对大豆胞囊线虫的抗性密切相关^[3]。肌醇是植物生长发育的必要条件, 肌醇在植物体内作为重要的前体和原料, 在细胞壁和细胞膜的生成、营养储存、生长繁殖、激素调节、渗透调节、信号传导、逆境调节等多种生命活动中发挥着重要的生理作用^[4-5]。而肌醇的氧化代谢过程则是游离的肌醇单体在肌醇加氧酶 (Myo-inositol oxygenase, MIOX) 的作用下氧化生成 D-葡萄糖醛酸 (D-Glucuronic acid), 这是肌醇氧化的重要途径, MIOX 是肌醇降解途径中的限速

酶^[6]。最早在植物上的研究, 要追溯到, Shannon R. Alford^[7] 研究在拟南芥中, 肌醇加氧酶对低营养条件的响应的研究, 结果表明在低营养条件下, 肌醇加氧酶通过影响植物体内肌醇含量的变化, 从而影响植物体在各个时期的根、茎、叶的生长以及开花时间。肌醇磷脂代谢系统还能够介导脱落酸 (ABA) 等胁迫信号传导, 脱落酸是控制植物对干旱、盐害和冷害等环境胁迫适应的关键激素^[8], 因此, 肌醇磷脂代谢系统对于植物在胁迫条件下的生长具有重要作用。肌醇加氧酶作为植物抗坏血酸生物合成的关键酶^[9], 不仅参与生长发育过程的调节, 还作为抗氧化剂清除活性氧类有害物质^[10]。

本试验在线虫胁迫条件下, 通过比较不同抗感品种在不同时期根中肌醇加氧酶活力的变化情况, 判断肌醇加氧酶在大豆抗大豆胞囊线虫过程中所发挥的作用。

收稿日期: 2018-08-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助 (31330063)。

第一作者简介: 王学敏 (1992 -), 男, 硕士, 主要从事大豆胞囊线虫抗性基因相关研究。E-mail: 2528745520@qq.com。

通讯作者: 王惠 (1972 -) 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆抗病、抗逆机制和分子生物学研究。E-mail: wanghuisyau@sina.com。

段玉玺 (1964 -), 男, 博士, 教授, 主要从事植物病理学和植物线虫学研究。E-mail: duanyx6407@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

感病大豆品种:辽豆 15;抗病大豆品种:灰皮支黑豆、哈尔滨小黑豆、小粒黑豆。大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)3 号生理小种,由沈阳农业大学北方线虫所试验圃繁殖基地繁殖。

供试试剂和药品有液氮、磷酸二氢钾(KH_2PO_3)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_3)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、去离子水(H_2O)。植物肌醇加氧酶(MIOX)酶联免疫分析试剂盒购自上海酶联免疫生物公司。

1.2 试验设计

本试验选取大豆根部为试验材料,通过肌醇加氧酶酶联免疫试剂盒分别测定第 0,5,10,15,20,25 天的接种线虫和未接种线虫大豆根中的肌醇加氧酶活力,通过不同抗感品种中肌醇加氧酶活力的差异,判断肌醇加氧酶活力的变化是否与大豆抗大豆胞囊线虫存在相关性。

1.3 方法

1.3.1 大豆胞囊线虫的接种 首先通过胞囊重糖离心法,孵育成二龄幼虫(J2)。同时将供试大豆种子用湿润的医用纱布包裹催芽,之后将其转移到装有高温灭菌的沙土混合物(体积比 1:2)的塑料钵(16 cm×16 cm)中。在大豆长出两片真叶时人工接种1 500 条·mL⁻¹的 J2 于大豆根部。不接种作为对照。0-25 d 取接种与不接种的抗病、感病植株根系,每个品种随机取 3 株。

1.3.2 PBS 匀浆液的配置 分别称取磷酸二氢钾(KH_2PO_3)0.27 g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_3)1.42 g,氯化钠(NaCl)8 g,氯化钾(KCl)2 g,去离子水(H_2O)800 mL 配置混匀后,调节至 pH7.2~7.4,定容至 1 000 mL,备用。

1.3.3 样品的处理

(1)样本保持鲜重,取重量不低于 50 mg 的组织于液氮冻存,冻存的样本解冻后用滤纸吸干周围水分(不能挤压组织)然后称重。

(2)组织匀浆的比例按照 10% 进行(相当于 1 g 样本加 9 mL 的匀浆液),匀浆液选取 PBS,浓度为 0.01 mol·L⁻¹,pH7.2~7.4。

(3)将称取重量的样本剪碎,放入研钵中,液氮碾成粉末,然后加入匀浆液,离心取上清待检。

(4)离心转速控制在 4 000~5 000 r·min⁻¹,15 min。

1.3.4 肌醇加氧酶活力的测定

(1)操作步骤

将处理好的样品按照酶联免疫试剂盒的操作说明书进行处理后,450 nm 波长依次测量各孔的吸光

度(OD 值)。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

(2)酶活力的计算

以标准物的酶活力为横坐标,OD 值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的酶活力;再乘以稀释倍数;或用标准物的酶活力与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品酶活力,再乘以稀释倍数,即为样品的实际酶活力。

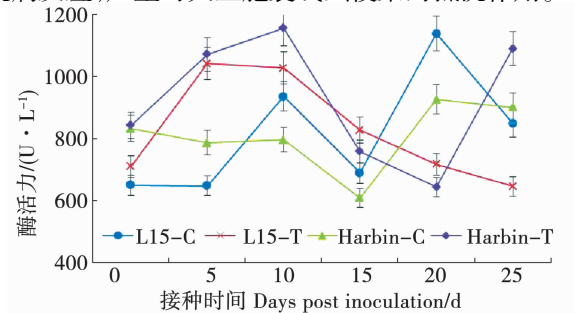
1.4 数据分析

采用 Graph Pad Prism 5.0 软件进行数据分析和作图。

2 结果与分析

2.1 哈尔滨小黑豆根内肌醇加氧酶活性的变化

由图 1 可知,接种 25 d 后未接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种的抗病品种哈尔滨小黑豆和感病品种辽豆 15 根内肌醇加氧酶活性略有差异,但差异不大。接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种 25 d 后,哈尔滨小黑豆和辽豆 15 根内肌醇加氧酶活性的差异高于未接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种的对照组间差异,从而也说明大豆在大豆胞囊线虫胁迫侵染后期可以诱导肌醇加氧酶的特异表达,导致其活性的改变。哈尔滨小黑豆根内肌醇加氧酶活性呈先上升、再降低、后升高的变化趋势。而感病品种辽豆 15 根内肌醇加氧酶活性呈先升高、再降低的变化趋势。抗病品种哈尔滨小黑豆在接种后的第 10 天酶活力达到最大,显著高于未接种的对照组。而感病品种辽豆 15 在接种后的第 5 天酶活力达到最大。这也间接表明,大豆在大豆胞囊线虫侵染后,抗病品种哈尔滨小黑豆能够及时表达抗病相关的酶及蛋白,产生抗病反应,产生对大豆胞囊线虫侵染的抵抗作用。



L15-C:未接种的辽豆 15;L15-T:接种的辽豆 15;Harbin-C:未接种的哈尔滨小黑豆;Harbin-T:接种的哈尔滨小黑豆。

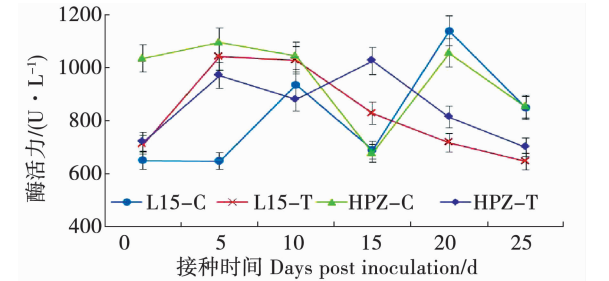
L15-C; Uninoculated Liaodou15; L15-T; Inoculated Liaodou15; Harbin-C; Uninoculated Harbin Xiaohaidou; Harbin-T; Inoculated Harbin Xiaohaidou.

图 1 哈尔滨小黑豆根内肌醇加氧酶活力的变化

Fig.1 Change of MIOX activity of Harbin Xiaohaidou root

2.2 灰皮支黑豆根内肌醇加氧酶活性变化

由图2可知,在未接种大豆胞囊线虫3号生理小种的条件下,抗病品种灰皮支黑豆和感病品种辽豆15根内肌醇加氧酶活力的变化在0-10 d时出现明显差异,且抗病品种灰皮支黑豆根内肌醇加氧酶活力显著高于感病品种辽豆15根中肌醇加氧酶的酶活力,而在10-25 d时,抗病品种灰皮支黑豆和感病品种辽豆15根内肌醇加氧酶活力的变化趋势基本一致。接种大豆胞囊线虫3号生理小种后,在接种前期,抗病品种灰皮支黑豆肌醇加氧酶活力略低于感病品种辽豆15根内肌醇加氧酶活力,而在接种后期,抗病品种灰皮支黑豆根内肌醇加氧酶活力显著高于感病品种辽豆15根内肌醇加氧酶活力,同时也显著高于未接种的对照组,在接种后第15天酶活力达到最大。说明抗病品种灰皮支黑豆在大豆胞囊线虫3号生理小种胁迫下,其根内的肌醇加氧酶活力在接种后期发生明显变化。



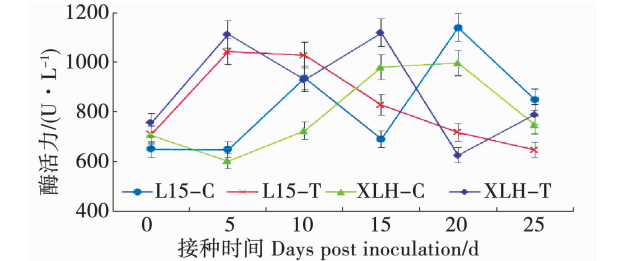
L15-C: 未接种的辽豆15; L15-T: 接种的辽豆15; HPZ-C: 未接种的灰皮支黑豆; HPZ-T: 接种的灰皮支黑豆。
L15-C: Uninoculated Liaodou15; L15-T: Inoculated Liaodou15; HPZ-C: Uninoculated Huipizhiheidou; HPZ-T: Inoculated Huipizhiheidou.

图2 灰皮支黑豆根内肌醇加氧酶活力的变化
Fig. 2 Change of MIOX activity of Huipizhiheidou root

2.3 小粒黑豆根内肌醇加氧酶活性变化

由图3可知,抗病品种小粒黑豆根内肌醇加氧酶活力整体呈现先升高后降低的变化趋势。除接种20 d外,接种大豆胞囊线虫3号生理小种的小粒黑豆根内肌醇加氧酶的酶活力均高于未接种大豆胞囊线虫3号生理小种大豆根内肌醇加氧酶的酶活力,且在接种后的第5天酶活力差异达到最大,接种的小粒黑豆中肌醇加氧酶活力约是未接种对照组的1.85倍。而感病品种辽豆15根内肌醇加氧酶活力在未接种条件下,其变化趋势呈先升高之后下降、再升高再下降的变化趋势,在接种大豆胞囊线虫3号生理小种条件下,感病品种辽豆15根内肌醇加氧酶活力呈先上升,后下降的趋势,在接种后的第5天时酶活力达到最大,约是对照组的1.61倍。以上结果表明,在大豆胞囊线虫侵染条件下,抗病

品种小粒黑豆在接种大豆胞囊线虫和未接种条件下其根内肌醇加氧酶活力差异性较感病品种辽豆15更大。间接证明,在大豆胞囊线虫侵染条件下,抗病品种小粒黑豆肌醇加氧酶活性变化更明显。



L15-C: 未接种的辽豆15; L15-T: 接种的辽豆15; XLH-C: 未接种的小粒黑豆; XLH-T: 接种的小粒黑豆。
L15-C: Uninoculated Liaodou15; L15-T: Inoculated Liaodou15; XLH-C: Uninoculated Xiaoliheidou; XLH-T: Inoculated Xiaoliheidou

图3 小粒黑豆根内肌醇加氧酶活力的变化
Fig. 3 Change of MIOX activity of Xiaoliheidou root

3 讨论

肌醇(inositol)是一种循环多元醇,通常在原核细胞和真核细胞中合成^[11]。常被用作新陈代谢过程中的信号转导、激素调节、磷含量库^[12-15]。植物细胞中,肌醇水平的维持对于调节植物自身稳定性具有重要意义。参与肌醇合成的酶是通过肌醇磷酸合酶(MIPS)的作用^[16]。而肌醇氧化代谢则通过肌醇加氧酶的催化^[17]。在肌醇加氧酶催化肌醇代谢过程中,肌醇加氧酶通过嵌入氧分子中的单个氧原子从而打开肌醇的环状结构^[18]。在拟南芥中,肌醇加氧酶(MIOX)被4个家族基因编码合成(At1g14520、At2g19800、At4g26260和At5g56640)^[19-20]。肌醇加氧酶家族的4个基因在调节植物生长的过程中起到不同的作用,其中MIOX2是主效基因,而MIOX4和MIOX5在植物再生阶段表达显著。肌醇加氧酶基因的缺失降低了参与植物细胞壁合成过程中肌醇的量,已有研究证明肌醇加氧酶基因家族,在植物细胞壁合成过程中表现活跃,对植物细胞壁的合成起到重要的作用^[21]。肌醇加氧酶作为植物抗坏血酸生物合成的关键酶,不仅参与生长发育过程的调节,还作为抗氧化剂清除活性氧类有害物质。大豆作为大豆胞囊线虫的寄主,在长期协同互作的过程中形成了较为复杂的关系。大豆胞囊线虫作为一种生物胁迫,通过寄生在大豆根部,吸收营养,完成自身的生长发育和繁殖,在对植物造成一定伤害的同时,寄主植物大豆也对大豆胞囊线虫产生了多种抗性机制的协同作用。

本试验通过测定在大豆胞囊线虫 3 号生理小种侵染前后,不同抗感大豆品种根内肌醇加氧酶活力的变化和差异,证明了肌醇加氧酶与大豆抗大豆胞囊线虫的抗性相关。肌醇结构简单,并且其独特的生物化学特性决定了它在植物的代谢中发挥着重要的作用,尤其是在应对逆境胁迫方面。通过基因工程技术从基因水平改良植物的肌醇代谢水平,进而培育出具有优良抗逆性状的植株,将会推动植物抗逆工程的研究。而肌醇代谢过程中的关键酶肌醇加氧酶的研究已经在多种植物中展开,并且取得了一定的进展,在植物抗逆过程中的具体作用机制研究尚待深入。

4 结 论

本研究通过测定接种与未接种处理条件下,不同时期内抗感品种大豆根中肌醇加氧酶活力,发现在接种后的第 5 天,感病品种辽豆 15 酶活力达到最大值。而抗病品种哈尔滨小黑豆、灰皮支黑豆和小粒黑豆分别在接种后的第 10、15 和 5 天,肌醇加氧酶活力达到最高。抗感品种间酶活力差异并不存在特定的规律性,其原因可能是不同大豆品种抗线虫机制存在差异,还有待继续研究。但不同的处理方式发现,各个品种的对照组和处理组差异明显,证明肌醇加氧酶活力的大小与大豆胞囊线虫抗性存在一定联系。

参考文献

[1] 吴海燕, 远方, 陈立杰, 等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. 大豆科学, 2001(4): 285-289. (Wu H Y, Yuan F, Chen L J, et al. Advances in soybean cyst nematode and mechenism of soybean resistance to *Heterode a* glycines[J]. Soy-bean Science, 2001(4): 285-289.)

[2] Wrather J A, Stienstra W C, Koenning S R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998 [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 23(2): 122-131.

[3] Endres S, Tenhaken R. Myoinositol oxygenase controls the level of myoinositol in *Arabidopsis*, but does not increase ascorbic acid [J]. Plant Physiology, 2009, 149(2): 1042-1049.

[4] Michell R H. Inositol derivatives: Evolution and functions[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(2): 151-161.

[5] Michell R H. Evolution of the diverse biological roles of inositols [J]. Biochemical Society Symposium, 2007, 74: 223-246.

[6] Hinterberg B, Klos C, Tenhaken R. Recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean[J]. Plant Physiology and Biochemis-try, 2002, 40(12): 1011-1017.

[7] Alford S R. Molecular characterization of two myo-inositol oxygen-ases in *Arabidopsis thaliana* [D]. Blacksburg : Virginia Polytech-nic Institute and State University, 2009.

[8] 都浩. 水稻中激素和肌醇磷酸代谢相关基因的抗逆功能研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2013. (Du H. Hormones and inositol phosphate metabolism related genes in rice research art function [D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University, 2013.)

[9] Lorence A, Chevone B I, Mendes P, et al. Myo-inositol oxygen-ase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1200-1205.

[10] Schoenfeld J D, Sibenaller Z A, Mapuskar K A, et al. O₂-and H₂O₂-mediated disruption of Fe metabolism causes the differential susceptibility of NSCLC and GBM cancer cells to pharmacological ascorbate[J]. Cancer Cell, 2017, 31(4): 487-500.

[11] Michell R H. Evolution of the diverse biological roles of inositols [J]. Biochemical Society Symposium, 2007, 74(2): 223-246.

[12] Loewus F A, Loewus M W. Myo-inositol: Its biosynthesis and me-tabolism[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1983, 34(1): 137-161.

[13] Loewus F A, Murthy P P. Myo-Inositol metabolism in plants[J]. Plant Science, 2000, 150(1): 1-19.

[14] Gillaspay G E, Ercetin M E, Burnette R N. Inositol metabolism in plant cells: A genomics perspective[J]. Advances in Plant Physi-ology, 2004, 7: 145-158.

[15] Gillaspay G E. The cellular language of myo-inositol signaling[J]. New Phytologist, 2011, 192(4): 823-839.

[16] Donahue J L, Alford S R, Tora binejad J, et al. The *Arabidopsis thaliana*myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for myo-inositolsynthesis and suppression of cell death [J]. Plant Cell, 2010, 22(2): 888-903.

[17] Arner R J, Prabhu K S, Thompson J T, et al. Myo-Inositol oxygen-ase: Molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxi-dizes myo-inositol and D-chiro-inositol[J]. Biochemical Journal, 2001, 360(2): 313-320.

[18] Moskala R, Reddy C C, Minard R D, et al. An oxygen-18 tracer investigation of the mechanism of myo-inositol oxygenase[J]. Bio-chemical and Biophysical Research Communications, 1981, 99(1): 107-113.

[19] Kanter U, Usadel B, Guerineau F, et al. The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleo-tide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides [J]. Planta, 2005, 221(2): 243-254.

[20] Endres S, Tenhaken R. Myo-inositol oxygenase controls the level of myo-inositol in *Arabidopsis*, brackcross progeny to entry and de-velopment of heterodera glycines [J]. Plant Physiology, 2011, 149: 788-798.

[21] Endres S, and Tenhaken R. Myo-inositol oxygenase controls the level of myo-inositol in *Arabidopsis*, but does not increase ascorbic acid[J]. Plant Physiol, 2009, 149: 1042-1049.