

大豆胰蛋白酶抑制剂与大豆抗大豆胞囊线虫的关系

杨少旭, 段玉玺, 陈立杰, 王 雪, 周 博

(沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:对大豆胞囊线虫3号小种的抗病品种 Hartwig 和小粒黑豆, 感病品种辽豆15 和中黄28 分别接种线虫, 检测大豆根系中大豆胰蛋白酶抑制剂的表达量对大豆抗胞囊线虫的抗性。经过胰蛋白酶抑制剂活性测定结果表明, 接种大豆胞囊线虫的抗感品种的大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)表达量明显高于未接种的品种, 各个品种的 STI 表达量也不同。说明大豆胰蛋白酶抑制剂参与抗病过程。但是各个品种的变化趋势并不相同, 表明抵御线虫的抗病作用机制存在品种间差异。

关键词:大豆胰蛋白酶抑制剂; 大豆胞囊线虫; 抗性

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2008)03-0487-03

Relationship of Soybean Trypsin Inhibitor and Soybean Resistance to Soybean Cyst Nematode

YANG Shao-xu, DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie, WANG Xue, ZHOU Bo

(Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: The resistance of soybean trypsin inhibitor(STI) to the race 3 of soybean cyst nematode(*Heterodera glycines* Ichinohe, SCN) were studied by inoculating SCN to resistant varieties, Hartwig, Xiaoliheidou and susceptible cultivars, Liaodou 15, Zhonghuang 28. Results showed that the activity of STI with inoculation was higher than that without inoculation and the STI activity were also different among varieties. The dynamic trends of STI were varied with varieties. Results suggest that STI had attended the resistance of soybean to SCN and the resistant mechanism maybe different among soybeans.

Key words: Soybean trypsin inhibitor; Soybean cyst nematode; Resistance

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)是一种世界上最为严重的经济作物病原物并广泛分布在大豆种植区域。大豆种子中包含两种重要的蛋白酶抑制剂, 库尼兹胰蛋白酶抑制剂(Kunitz trypsin inhibitor, KTI)和鲍曼勃克胰蛋白酶抑制剂(Bowman-Birk trypsin inhibitor, BBI)^[1], 他们都属于丝氨酸蛋白酶抑制剂。KTI 是最为重要的胰蛋白酶抑制剂类型, 分子量为 21KD, 主要专一抑制胰蛋白酶, BBI 分子量 8KD, 主要抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶^[2]。在大豆体内, 蛋白酶抑制剂主要作为储藏蛋白存在, 在遭受病虫害侵入时也作为防御蛋白存在。目前, 人们对胰蛋白酶抑制剂已经有较为深入的研究。胰蛋白酶抑制剂基因被转入烟草中显示出了对鳞翅目昆虫有明显的抑制作用^[3]。

从白菜、玉米、大麦等作物中发现的胰蛋白酶抑制剂, 对真菌也有很好的拮抗作用。而大豆胰蛋白酶抑制剂对抗线虫的方面的作用却鲜有报道, 尤其是在抗大豆胞囊线虫方面。因此, 为了找出大豆胰蛋白酶抑制剂对大豆胞囊线虫的拮抗作用, 对不同大豆品种根部进行了胰蛋白酶抑制剂的活性测定, 以寻求两者之间的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 供试大豆品种

抗病品种: Hartwig, 小粒黑豆。

感病品种: 辽豆 15, 中黄 28。

1.2 试验方法

1.2.1 胞囊和卵收集 在沈阳农业大学大豆胞囊

收稿日期: 2008-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20372064); 十一五科技支撑计划资助项目(2006BAD08A08)。

作者简介: 杨少旭(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事大豆抗胞囊线虫研究。

通讯作者: 段玉玺, 教授, 博士。Tel: 024-88454528; E-mail: duanyx6407@163.com。

线虫 3 号小种试验地获取土样,淘洗过筛获取胞囊^[4]。选取饱满的单个胞囊于载玻片上压碎,制成卵悬液。将卵悬液接种到感病品种辽豆 15,无菌土栽培,35 d 扣盆,获取胞囊。将获得的胞囊继续接种,直至获得的胞囊量满足试验所需。获得的胞囊保存于 4℃ 冰箱。

1.2.2 大豆根系获得 将供试大豆品种用湿润的医用纱布包裹,置于直径 9 cm 的培养皿中,25℃,黑暗催芽 3 d,期间及时换水。催芽后,幼苗移栽至直径 20 cm 的花盆中,无菌土栽培,随机放置花盆,定期管理,在豆苗三叶期(出苗后 11 d)接种,每盆 6 000 个卵。分别在出苗后 15、20、25、30、35 d 定时取样,保证单株取样,样品 -80℃ 保存,3 次重复。

1.2.3 接种效果检测 在接种 15 d 后,随机挑取感病品种,取根进行根染色^[4],检测线虫是否侵入,拍照记录。在 35 d,取根调查胞囊数,记录结果。

1.2.4 胰蛋白酶抑制剂活性测定方法 参照中华人民共和国国家标准大豆制品中胰蛋白酶抑制剂的活性测定^[5]和“ACC(美国谷物化学家协会)^[6]”方法,稍有改动。

2 结果与分析

2.1 接种及大豆品种抗性检测

经过根部染色和胞囊收集,从图 1 可以清晰的看出线虫侵入到品种的根部,表 1 为根部胞囊的数量,表明辽豆 15、中黄 28 为感病品种,小粒黑豆为抗病品种,而 Hartwig 则是对 3 号小种的免疫品种。

表 1 各个品种大豆根部的胞囊数量

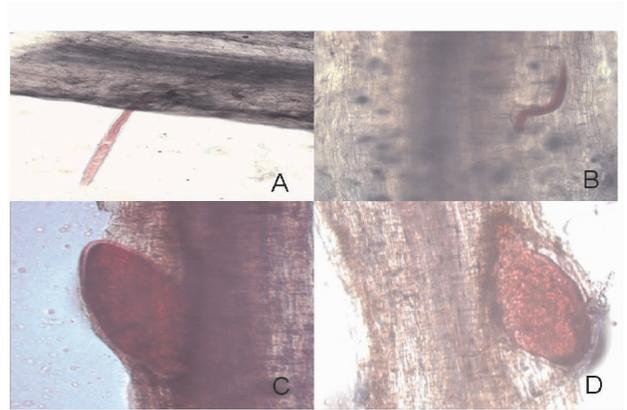
Table 1 Number of cysts in the roots of soybeans		
品种 Varieties	平均胞囊数量 Mean	抗感类别 R or S
中黄 28 Zhonghuang 28	26.4	感病 S
辽豆 15 Liaodou 15	19.2	感病 S
小粒黑豆 Xiaoliheidou	2.4	抗病 R
Hartwig	0	抗病 R

R:resistant;S:susceptible

2.2 接种的大豆品种和未接种的大豆品种 STI 表达量比较

由图 2 可知,随着生长期的推进,各个品种都在 20 d 后,STI 活性呈现下降趋势。说明 STI 可能作为储藏蛋白,一开始参加了营养代谢,而在大豆后期生长中起到微弱的作用。

由图 3 可知,各个品种在出苗后第 15 天时 STI



A:二龄幼虫侵入根部;B:三龄幼虫侵入根部;C:四龄幼虫侵入根部;D:雌虫侵入根部。

A:J₂ invaded in the soybean root; B:J₃ invaded in the soybean root; C:J₄ invaded in the soybean root; D:the female invaded in the soybean root.

图 1 大豆胞囊线虫各个虫态侵入大豆根部

Fig. 1 Different stages of SCN invading in the soybean roots

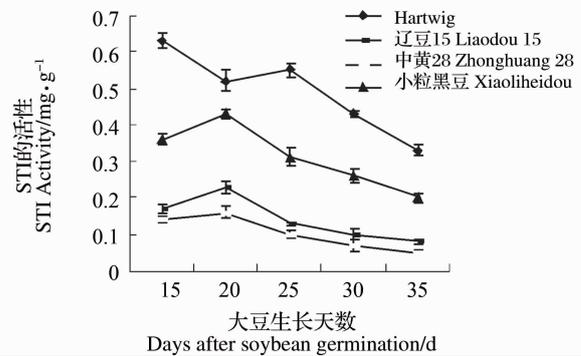


图 2 未接种大豆品种根部的 STI 活性表达

Fig. 2 The STI activity of noninoculated soybean varieties

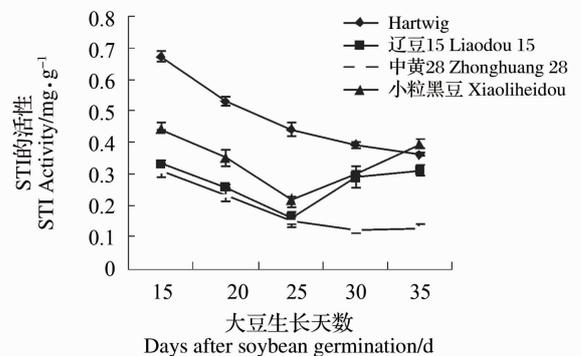


图 3 接种大豆品种根部的 STI 活性表达

Fig. 3 The STI activity of inoculated soybean varieties

表达量非常高,随时间增长而降低。感病对照辽豆 15 和小粒黑豆在第 25 天降到最低,随后又有回升。由于接种是在三叶期进行的,在出苗后第 15 天线虫已经开始甚至已经侵入大豆根部,这说明线虫已经

对大豆根系有刺激作用,导致了 STI 的表达量变化。

比较未接种和接种的的大豆品种中 STI 的变化:在线虫的侵染下,各个品种的 STI 表达量都有改变,抗病品种一般表达量都较高,而感病品种虽然也有较高水平表达,但都明显低于抗病品种。接种的大豆品种根系,不论是否抗病,在出苗后第 15 天,STI 表达量都比未接种的表达量要高,这在感病对照辽豆 15,中黄 28,小粒黑豆中都表现十分明显,而 Hartwig 表现并不明显。在线虫侵入根系后,抗感品种的 STI 表达量都呈下降趋势。直到第 25 天后,辽豆 15 和小粒黑豆中的 STI 表达量开始升高。到第 35 天,线虫完成一个生活史,这个品种的 STI 活性基本趋于稳定。缺失 STI 的中黄 28 却在侵入后 STI 表达量骤增,达到 $0.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,基本与感病对照辽豆 15 $0.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的表达量持平。随后就一直处于下降状态,但在第 35 天的表达量 $0.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 仍要比未接种时的表达量 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 高出很多。这些结果表明,不管是抗病或是感病品种,在遭受线虫侵入时,根系中 STI 表达量都会改变,STI 与抗病相关。

2.3 同一品种中 STI 量的分析

2.3.1 Hartwig 无论是否有线虫侵入,Hartwig 中 STI 的表达量始终处于下降状态。但是接种线虫的 Hartwig,在出苗后第 15 天,也就是线虫大量侵入的时期,接种的 STI 表达量 $0.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 大于未接种的表达量 $0.63 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而且接种的大豆在第 25 天后 STI 的表达量基本趋于平稳。说明线虫的存在对 Hartwig 起到了刺激作用,才使 STI 的表达变化。

2.3.2 中黄 28 线虫的侵入明显影响中黄 28 的 STI 表达量。中黄 28 是一个特殊的品种,它的种子内缺失 STI。但是 STI 在它的生长阶段是表达的,从图 2 中可以看出只是正常的表达量很低,而在接种线虫的表达量在一开始是很高的,之后一直下降。从根部收集到的胞囊数看,中黄 28 的抗病能力最差,这也说明 STI 在参与抗病的过程中,由于表达量不够高,无法达到阻止线虫扩展的作用。

2.3.3 小粒黑豆和辽豆 15 研究发现,未接种的大豆,STI 参加了正常的生长代谢,而接种后的大豆 STI 表达量剧增,随后下降。辽豆 15 和小粒黑豆 STI 量同时增加,且两者的变化规律相似。小粒黑豆中的 STI 表达量始终高于辽豆 15。在第 25 天时,小粒黑豆中的 STI 表达量为 $0.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,高于辽豆 15 的 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的表达量,而在 30 到 35 d 辽豆 15 的 STI 表达量逐渐降低,小粒黑豆的表达量则在

一个较高的水平。这说明 STI 的表达量的大小与对线虫抗性有关。

3 讨论

每种植物在抵御病原物侵入时,都会产生一套自身的防御体系。这时,它们自动调节体内各种酶系的量发生改变,来保护自己,以避免,中止或阻止病原物的继续侵入与扩展^[7]。因此,植物对线虫的抗性表现在阻止线虫侵入或使侵入的线虫不能继续发育繁殖等多方面。比较接种线虫的大豆与未接种的对照,在线虫侵入后,所有品种 STI 的表达量都明显高于对照,说明 STI 可能参加了抗病过程。在根染色时发现,所有品种都有 2 龄幼虫大量侵入,说明 STI 不能阻止线虫的侵入,但是后期调查抗病品种时发现根部不产生胞囊或产生少量胞囊,说明 STI 可能抑制线虫继续发育繁殖。据文献报道,由于大豆胞囊线虫本身具有胰蛋白酶活性,在取食过程中分泌胰蛋白酶^[8],而大豆各品种在线虫刺激下能分泌胰蛋白酶抑制剂,使线虫的发育受阻。研究证明胰蛋白酶抑制剂可以引起马铃薯白线虫雌虫虫体变小,雌雄比发生改变^[9],这可能就是 STI 的抗病机制。但通过研究发现胰蛋白酶抑制剂直接作用于离体线虫作用并不明显。

大豆不同品种间的抗性差异直接影响到了 STI 的表达量,进而影响到了对线虫的抵御作用。线虫侵染时,抗病品种不能有效阻止线虫侵入,大量的二龄幼虫仍然会侵入根部,但是线虫完成生理周期时却基本不形成胞囊,致使线虫无法完成生活史。而感病品种,二龄幼虫不仅会大量侵入它们体内,而且在后期可以繁育自己的下一代。虽然它们也产生 STI 或其它物质来抵御侵入与扩展,但是由于它们体内的 STI 表达量太低,起不到足以抵御线虫的作用,因此最终产生大量的胞囊。推测 STI 在抵御线虫扩展中起到了重要作用。

致谢:中国农业科学院作物育种栽培研究所孙君明老师提供了种子内胰蛋白酶缺失的大豆品种中黄 28,特此表示感谢!

参考文献

- [1] Pesic M B, Vucelic - Radovic B V, Barac M B, et al. Influence of different genotypes on trypsin inhibitor levels and activity in soybeans[J]. Sensors 2007(7):67-74.

(下转第 495 页)

- graminearum and their properties[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1994, 24(4): 373-377.)
- [7] 王美琴, 刘慧平, 张智广, 等. 番茄叶霉病菌对多菌灵抗药性的诱导及抗性菌株特性研究[J]. 植物保护, 2004, 3(5): 55-59. (Wang M Q, Liu H P, Zhang Z G, et al. Resistance induction of *Fulvia fulva*(Cooke) Ciferri to carbendazim and bionomics of resistant- mutants[J]. Plant Protection, 2004, 3(5): 55-59.)
- [8] 王洪凯, 林福呈, 柴荣耀, 等. 稻瘟病菌温度敏感型突变体的筛选[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(4): 357-361. (Wang H K, Lin F C, Cai R Y, et al. Screening of temperature sensitive mutants in *magnaporthe grisea*[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2004, 18(4): 357-361.)
- [9] 张赛群, 朱红梅, 周涵韬, 等. 紫外线对番茄青枯菌致病性变化的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(增刊): 59-62. (Zhang S Q, Zhu H M, Zhou H T, et al. Effect of UV-ray on virulence of *Ralstonia solanacearum* for Tomato Bacterial Wilt[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2004, 43(S1): 59-62.)
- [10] 袁善奎, 周明国. 玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*)对多菌灵的室内抗药突变体的诱导及其抗药性遗传分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 363-368. (Yuan S K, Zhou M G. Induction and genetic analysis of laboratory mutants of *Gibberella zeae* resistance to carbendazim [J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(4): 363-368.)
- [11] 于红梅, 左豫虎, 马丽丽. 紫外线对大豆疫霉菌生物学性状的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(6): 20-24. (Yu H M, Zuo Y H, Ma L L. Effects of UV radiation on biological characters of *Phytophthora sojae*[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2006, 18(6): 20-24.)
- [12] 臧忠婧, 左豫虎, 刘惕若, 等. 大豆疫霉菌的分离、鉴定及菌株致病力的测定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2000, 12(1): 37-42. (Zang Z J, Zuo Y H, Liu T R, et al. Study on pathogenicity, isolate method and identify of different isolations of *Phytophthora sojae*[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2000, 12(1): 37-42.)
- [13] Schmitthenner A F, Bhat R G. Useful methods for studying *Phytophthora* in the laboratory[M]//Ohio Agricultural Research and Development Center, Special Circular, Columbus, Ohio, USA, 1994: 7-8.
- [14] 左豫虎, 臧忠婧, 刘惕若. 影响大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)游动孢子产生的条件[J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 241-245. (Zuo Y H, Zang Z J, Liu T R. Studies on production condition of zoospores of *Phytophthora sojae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(3): 241-245.)
- [15] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 86-87. (Zheng X B. *Phytophthora* and experiment methods. Beijing: China Agricultural Press, 1997: 86-87.)
- [16] 左豫虎, 薛春生, 韩文革, 等. 大豆疫霉菌对大豆幼苗的侵染特性[J]. 植物保护学报, 2002, 29(4): 377-378. (Zuo Y H, Xue C S, Han W G, et al. The infections characteristics of *Phytophthora sojae* to soybean seedlings[J]. Journal of Plant Protection, 2002, 29(4): 377-378.)
- [17] 左豫虎, 侯巨梅, 康振生, 等. 大豆疫霉菌单孢分离物生物学性状的遗传变异研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 289-295. (Zuo Y H, Hou J M, Kang Z S, et al. Genetic variation of *Phytophthora sojae* on biological characters of single-zoospore and single-oospore cultures[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(4): 289-295.)
- [18] 井金学, 商鸿生, 李振岐. 紫外线照射对小麦条锈菌生物学效应的研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 299-304. (Jing J X, Shang H S, Li Z Q. The biological effects of ultraviolet ray radiation on wheat stripe rust(*Puccinia striiformis west.*) [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23(4): 299-304.)
- [19] 吴向辉. 苈麻疫霉抗甲霜灵菌株的生理生化研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004. (Wu X H. Studies on the physiological and biochemical characteristics of metalaxyl-resistant isolates in *Phytophthora boehmeriae*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2004.)
- [20] 左豫虎. 大豆疫霉菌遗传特性及侵染过程研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004: 66-76. (Zuo Y H. Inheritance and infection process of *Phytophthora sojae*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2004: 66-76.)
- (上接第489页)
- [2] Cotor C, Pintor-Toro J A, Romero L C. Isolation of a new member of the soybean kunitz-type proteinase inhibitors[J]. Plant Physiology, 1995, 107: 1015-1016.
- [3] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E, et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco[J]. Nature, 1987, 330: 160-163.
- [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. The technique of plant nematode research [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1995.)
- [5] Fitter J. A measure of conformational entropy change during thermal protein unfolding using neutron spectroscopy[J]. Biophysical Journal, 2003; 84(6): 3924-3930.
- [6] Clyde E S. Measuring trypsin inhibitor in soy meal; suggested improvements in the standard method[J]. Cereal Chemistry, 1990, 67(3): 296-302.
- [7] Gruis D, Schulze J, Jung R. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases[J]. Plant Cell, 2004, 16: 270-290.
- [8] Lilly C J, Urwin P E, Atkinson H J, et al. Characterization of cDNAs encoding serine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1997, 89(2): 195-207.
- [9] Arora S K. Chemistry and Biochemistry of Legumes[M]. London Edward Arnold, 1983: 217-227.