

## 蚜虫取食和机械损伤对大豆真叶中异黄酮的诱导作用

孟凡立<sup>1,2</sup>, 刘立承<sup>3</sup>, 李文滨<sup>2</sup>, 段玉玺<sup>1</sup>, 张大勇<sup>2</sup>, 李冬梅<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 植保学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 东北农业大学 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 齐齐哈尔出入境检验检疫局, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

**摘要:**采用高效液相色谱法,通过测定大豆真叶异黄酮含量的变化,探讨大豆蚜虫取食和机械损伤与大豆真叶异黄酮含量之间的化学诱导关系。结果表明:蚜虫取食诱导的异黄酮合成反应速度较快,而机械损伤处理诱导的异黄酮合成反应速度相对较慢;蚜虫取食引起大豆真叶内大豆黄酮和染料木素苷元含量的同时增加,而机械损伤处理提高大豆黄酮苷元含量却降低了大豆黄酮苷元含量;蚜虫取食能在相当长的时间内维持异黄酮含量的增加,而机械损伤处理只能在短时间内引起异黄酮含量的变化。因此,蚜虫取食和机械损伤处理所诱导的异黄酮含量变化的规律不同,蚜虫取食和机械损伤所诱导的大豆抗性不是完全对等的。

**关键词:**大豆蚜虫;异黄酮;虫害;机械损伤;诱导

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)02-0264-04

## Comparing on the Inducing Isoflavonoids Content in Leaf of Soybean Aroused by Soybean Aphid and Mechanical Damage

MENG Fan-li<sup>1,2</sup>, LIU Li-cheng<sup>3</sup>, LI Wen-bin<sup>2</sup>, DUAN Yu-xi<sup>1</sup>, ZHANG Da-yong<sup>2</sup>, LI Dong-mei<sup>2</sup>

(1. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning; 2. Soybean Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 3. Inspection and Quarantine Bureau of Qiqihaer, Qiqihaer 161005, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Experiments were conducted to determine whether the content of isoflavonoids is increased by the damage caused by soybean aphid and machines. Samples from leaf of soybean damaged by soybean aphid and machines were analyzed for isoflavonoids content with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Compared with mechanical damage, soybean aphid infection increased the synthetic velocity of isoflavonoids, hence, increased the daidzin and genistin content. Mechanical damage increased glycitin while reduced daidzin content. The duration of induction reaction in aphid-infested soybean persisted much longer than that of the mechanically damaged plants. Results suggest the changing trends of isoflavonoids content and the induced resistance resulted from the soybean aphid and the mechanical damage were quite different.

**Key words:** Soybean aphid; Isoflavonoids; Pest damage; Mechanical damage; Induce

在与昆虫协同进化的过程中,植物形成一系列的防御策略<sup>[1]</sup>。植物在受到昆虫取食伤害后可通过增加植物内的次生代谢产物或防御蛋白对昆虫代谢产生不利的影响。大豆异黄酮是普遍存在豆科植物中的一类酚类化合物的总称,是大豆重要的次生代谢产物之一<sup>[2]</sup>。Terrence 等研究表明大豆异黄酮在大豆抗大豆疫霉菌病(*Phytophthora sojae*)中起着重要作用<sup>[3]</sup>。Giorla 等发现梨豆夜蛾(*Anticarsia gemmatilis*)取食染料木素类异黄酮含量高的豆饲料后致死率增加,同时造成幼虫和蛹重量降低<sup>[4]</sup>。David 等研究表明,大豆胞囊线虫侵染大豆后诱导异黄酮合成相关基因表达量提高<sup>[5]</sup>。这些结果表明大豆异黄酮是豆科植物的化学防御物质之一。

大豆蚜虫属同翅目蚜虫科,起源于亚洲,2000年后快速扩展到美国和加拿大的大豆主要产区,大豆蚜虫已经成为广泛关注的重要农业害虫<sup>[6-7]</sup>。大量蚜虫取食大豆植株能使植物卷曲矮化,进而造成产量降低,蚜虫严重发生年份,若不防治可减产50%~70%。大豆蚜虫还是大豆花叶病毒的主要媒介,使大豆籽粒的斑驳加重,降低大豆的商品品质<sup>[8]</sup>。目前国内外学者从大豆抗蚜的资源筛选方面进行了研究,筛选出一些抗性资源<sup>[6-9]</sup>。有关大豆抗大豆蚜机制的研究,仅Li等利用基因芯片技术对大豆蚜取食的抗感大豆品种的基因表达差异进行比较,发现与抗性相关的上调表达基因140条<sup>[10]</sup>。该研究在前人研究的基础上,探讨大豆蚜虫取食和机械损伤与大豆真叶异黄酮含量之间的诱

收稿日期:2010-01-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800625);大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目(SB08A02)。

第一作者简介:孟凡立(1978-),女,在职博士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:fanli78@sina.com

导关系,对大豆的诱导抗性机制进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

大豆蚜虫于 2006 年夏天采自东北农业大学香坊农场大豆田,经鉴定后在人工气候箱内(25℃,相对湿度 70%)利用东农 47 幼苗进行繁殖。高异黄酮含量品种中豆 27 种植于 10 cm × 8 cm 的塑料钵中,每钵 1 株,挑选健康无病虫害的大豆苗为材料。异黄酮标准样品购于 Sigma 公司(美国)。分析乙醇购于北京化工厂。色谱甲醇购于 J. T. Baker 公司(美国)。P680 型高效液相色谱仪(HPLC)为美国戴安(DIONEX)公司生产。固相为 C18 反相柱(HI-CHROM316A-LOK(UK), 150 mm × 4.9 mm)。

### 1.2 试验设计

各试验均设对照和处理组。对照组是不做任何处理的大豆苗,处理组分为虫害和机械损伤组。虫害植株是大豆蚜虫取食后的大豆植株。取 V1 阶段的大豆苗用于试验,5 头除有翅外的各龄蚜虫接在真叶背面。机械损伤的植株是人为制造伤口的大豆植株。利用昆虫针在大豆植株真叶上刺 5 次。试验分为 2 部分:(1)虫害或机械损伤后 0 ~ 24 h 内真叶内异黄酮含量的变化的研究。将不同叶片处理的大豆植株在人工气候室内分别放置 0、3、6、12、24 h 后测定。(2)虫害或机械损伤后 2 ~ 7 d 内异黄酮含量的变化研究。将不同叶片处理的大豆植株在人工气候室内分别放置 1、2、3、4、5、6、7 d 后测定。

### 1.3 异黄酮含量的测定

采用张晓波等的方法进行样品的前处理<sup>[11]</sup>。用高效液相色谱仪进行大豆黄素、大豆染料木黄素和黄豆黄素的定量测定,最后根据张大勇等测定的标准曲线<sup>[12]</sup>:大豆黄素  $y = 1.0805x - 0.0463$ ,  $R^2 = 0.9988$ ;大豆染料木黄素  $y = 1.0132x - 0.0228$ ,  $R^2 = 0.9996$ ;黄豆黄素  $y = 2.4013x + 0.0061$ ,  $R^2 = 0.9990$  计其算含量。同时参照鞠兴荣等<sup>[13]</sup>提供的 3 种苷元与其相应葡萄糖化合物的换算系数<sup>[11]</sup>(分别为 1.64、1.60 和 1.54)进行换算。

样品的高效液相色谱检测条件同张大勇等<sup>[12]</sup>。流动相使用甲醇与水的混合液(甲醇:去离子水 = 50:50)。流速  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 54 nm,检测温度 50℃;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

### 1.4 数据分析

采用 Excel 2003 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 虫害或机械损伤处理后 0 ~ 24 h 真叶内异黄酮含量的变化

2.1.1 大豆黄素类异黄酮 虫害和机械损伤处理均能引起大豆真叶中大豆黄素类异黄酮含量的变化,但是这 2 种因素所引起的变化趋势有很大的差异(图 1)。大豆蚜取食大豆植株 3 h 时,其真叶内大豆黄素类异黄酮含量比对照植株显著增加,表明大豆蚜取食诱导大豆植株合成大豆黄素所需的时间很短。机械损伤处理 3 h 时,其真叶内大豆黄素类异黄酮含量略低于对照植株,机械损伤处理 3 h 后大豆黄素类异黄酮含量迅速升高,6 h 时大豆黄素类异黄酮合成量显著高于虫害和对照植株,表明机械损伤处理诱导大豆黄素类异黄酮合成的强度较高,但所需诱导时间较长。

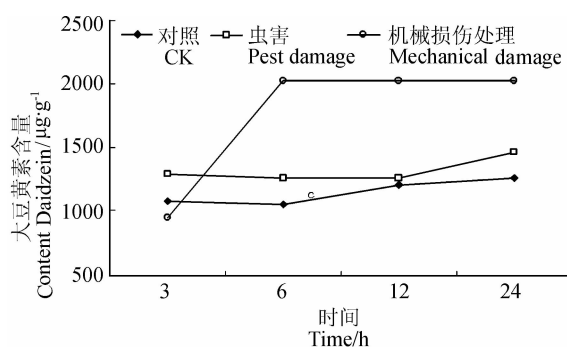


图 1 虫害或机械损伤处理后 0 ~ 24 h 真叶内大豆黄素含量的变化

Fig. 1 Content of Daidzin in the soybean from 0 ~ 24 h after damage on leaf

2.1.2 黄豆黄素类异黄酮 机械损伤处理后 3 h 大豆叶片内的黄豆黄素类异黄酮含量显著高于虫害和对照植株,随后机械损伤处理和虫害植株叶片内的黄豆黄素类异黄酮含量降低并逐渐与对照趋于一致(图 2)。

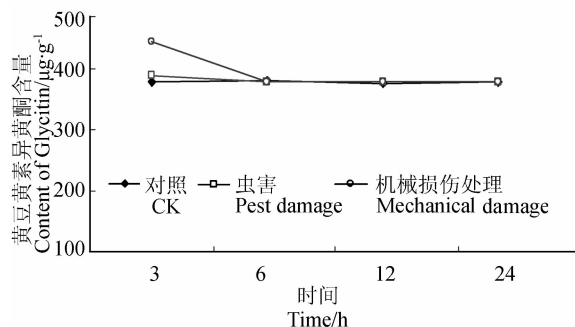


图 2 虫害或机械损伤处理后 0 ~ 24 h 真叶内黄豆黄素类异黄酮含量的变化

Fig. 2 Content of Glycitin in the soybean from 0 ~ 24 h after damage on leaf

2.1.3 染料木素类异黄酮 蚜虫取食和机械损伤处理诱导的染料木素类异黄酮含量变化趋势相似。虫害和机械损伤处理植株叶片内的染料木素类异黄酮的含量先升高,6 h 达到高峰且显著高于对照;6 h 以后染料木素类异黄酮含量下降,最后与对照趋于一致(图3)。

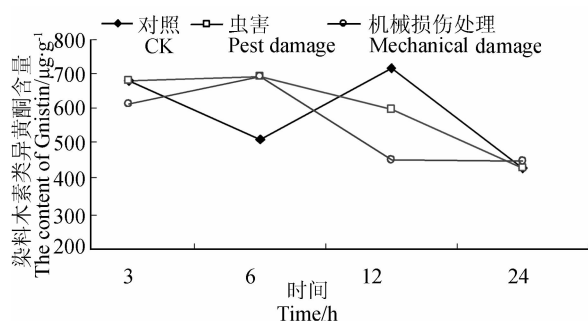


图3 虫害或机械损伤处理后0~24 h 真叶内染料木素类异黄酮含量的变化

Fig. 3 Content of Genistin in the soybean from 0~24 h after damage on leaf

2.1.4 总异黄酮 大豆蚜虫取食和机械损伤与对照相比均引起大豆真叶内总异黄酮含量的增加,但是2种处理所引起的变化趋势有很大不同(图4)。大豆蚜虫取食3 h 时异黄酮含量与对照植株相比显著提高,表明大豆受到蚜虫危害后总异黄酮合成反应的响应较快,蚜虫为害12 h 时异黄酮含量到达最高峰。机械损伤处理3 h 时异黄酮含量与对照比无明显的变化,6 h 时总异黄酮含量显著升高并达到最高峰,随后总异黄酮含量降低与虫害叶内总异黄酮含量趋于一致。

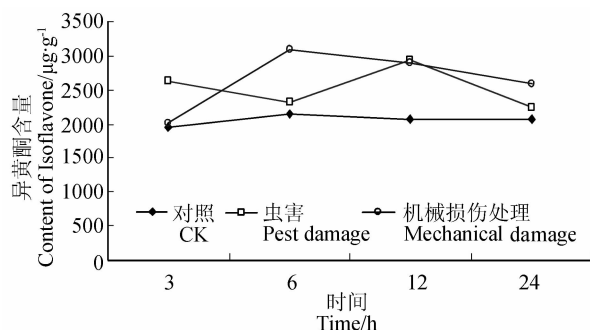


图4 虫害或机械损伤处理后0~24 h 真叶内总异黄酮含量的变化

Fig. 4 Content of Isoflavone in the soybean from 0~24 h after damage on leaf

## 2.2 虫害或机械损伤后2~7 d 真叶内异黄酮含量的变化

2.2.1 大豆黄素类异黄酮 蚜虫取食和机械损伤在较长时间内影响大豆真叶内的大豆黄素类异黄

酮合成(图5)。虫害植株大豆黄素类异黄酮的含量一直高于对照植株。机械损伤处理植株在前3 d 大豆黄素含量高于对照植株,3 d 后大豆黄素类异黄酮的含量迅速降低,显著低于对照。

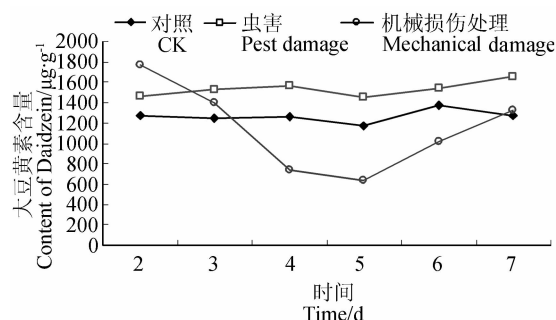


图5 虫害或机械损伤真叶后2~7 d 真叶内大豆黄素类异黄酮含量的变化

Fig. 5 Content of Daidzin in the soybean from 2~7 d after damage on leaf

2.2.2 黄豆黄素类异黄酮 从整体上看,蚜虫在大豆植株上长时间取食未能诱导虫害叶内黄豆黄素含量发生变化,而机械损伤处理的大豆真叶内黄豆黄素类异黄酮含量在3 d 后显著增加,5 d 时达到最高峰,随后黄豆黄素类异黄酮含量下降,但一直高于对照植株内黄豆黄素类异黄酮含量(图6)。

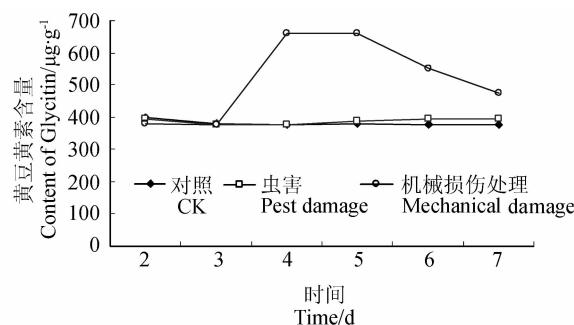


图6 虫害或机械损伤处理后2~7 d 真叶内黄豆黄素类异黄酮含量的变化

Fig. 6 Content of Glycitein in the soybean from 2~7 d after damage on leaf

2.3.3 染料木素类异黄酮 大豆蚜虫的长时间取食诱导使大豆真叶内染料木素类异黄酮含量显著增加。而机械损伤处理植株叶片内的染料木素含量随着时间延长,围绕对照植株上下波动,最后与对照趋于一致(图7)。

2.2.4 总异黄酮含量 随着大豆蚜虫取食时间的增加,虫害植株叶内的总异黄酮含量与对照植株相比显著增加,而且其增加幅度显著高于0~24 h。机械损伤处理大豆植株叶内总异黄酮含量与对照相比呈下降趋势,但随着时间延长逐渐与对照植株趋于一致(图8)。

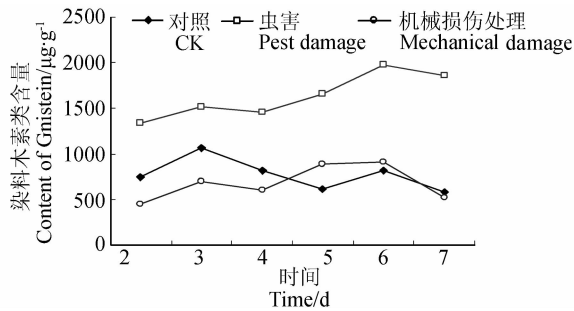


图7 虫害或机械损伤处理后2~7 d真叶内染料木素类异黄酮含量的变化

Fig.7 Content of Gnistin in the soybean from 2~7 d after damage on leaf

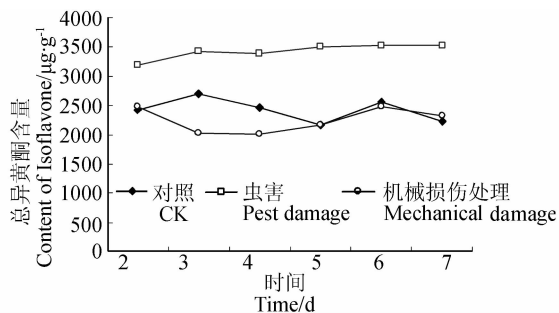


图8 虫害或机械损伤处理后2~7 d真叶内染料木素类异黄酮含量的变化

Fig.8 Content of Isoflavone in the soybean from 2~7 d after damage on leaf

### 3 结论与讨论

不同植物因昆虫为害而诱导次生化合物合成时间不同,从几小时到几天不等<sup>[14]</sup>。该研究中,大豆蚜虫取食大豆真叶后不到3 h,其内大豆黄酮、染料木素含量明显增加,表明大豆被诱导产生化学防御的速度较快。

虫害和机械损伤处理均能诱导大豆叶片内的总异黄酮含量及3种苷元组分含量变化,但蚜虫取食和机械损伤处理引起的总异黄酮含量及3种苷元组分含量变化存在显著差异。首先,从诱导的时间来看,蚜虫诱导异黄酮合成所需时间较短,只需3 h,而机械损伤所需的时间相对较长,需要6 h。其次,从长时间的异黄酮苷元组分含量的变化来看,蚜虫直接取食引起大豆真叶内大豆黄酮和染料木素苷元含量的同时增加,从而使虫害植株叶片内总异黄酮含量显著增加,表明大豆黄酮和染料木素可能在大豆抵御蚜虫为害的过程中起作用;机械损伤处理却使大豆叶内的大豆黄酮类异黄酮含量降低,而增加黄豆黄酮类异黄酮含量。最后,从诱导反应持续的时间来看,蚜虫在大豆真叶上的持续取食使虫害植株内大豆黄酮和染料木素苷元及总异黄酮含量显著高于对照植株;而机械损伤只是在24 h内引起总异黄酮合成量的增加。由此可见,与植物的其它防御反应一样,植食昆虫取食和机械损伤不是完全对等的。单纯的机械损伤,在损伤形成后植株

所产生的代谢物消失较快,而植食性昆虫取食活动使植物诱导出来的代谢物质能够在损伤后维持相当长的时间<sup>[15]</sup>。植物取食对寄主植株造成的影响包括口器的机械损伤和口腔分泌物对植株的化学诱导作用。因此,蚜虫持续取食和取食口腔的分泌物可能是造成蚜虫取食和机械损伤诱导异黄酮含量变化差异的主要因素。

### 参考文献

- [1] Alder L S. Alkaloid uptake increases fitness in a hemiparasitic plant via reduced herbivory and increased pollination [J]. The American Naturalist, 2000, 156: 92-99.
- [2] Dhaubhadel S, McGarvey B D, Williams R, et al. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 53: 733-743.
- [3] Graham T L, Graham M Y, Subramanian S, et al. RNAi silencing of genes for elicitation or biosynthesis of 5-deoxyisoflavonoids suppresses race-specific resistance and hypersensitive cell death in *Phytophthora sojae* infected tissues [J]. Plant Physiology, 2007, 44: 728-740.
- [4] Giorla C P, Clara B H, Flavio M, et al. Are chemical compounds import for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis* [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31: 1509-1524.
- [5] David L. Proteomic and metabolite analysis of nematode resistance [M]. Plant Physiology Preview, 2009: 1-54.
- [6] Hill C B, Li Y, Hartman G L. Resistance to the soybean aphid in soybean germplasm [J]. Crop Science, 2004, 44: 98-106.
- [7] Venette R C, Ragsdale D W. Assessing the invasion by soybean aphid (Homoptera: Aphididae): where will it end [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2004, 97: 219-226.
- [8] Clarice M, Christnina D F, Randall L, et al. Resistance to soybean aphid in early maturing soybean germplasm [J]. Crop Science, 2005, 45: 2228-2233.
- [9] 武天龙, 马晓红, 姚陆明, 等. 大豆抗性资源抗性的鉴定分析 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1258-1263. (Wu T L, Ma X H, Yao L M, et al. Identification of soybean resources with resistance to aphids [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(4): 1258-1263.)
- [10] Yan L, Ji J Z, Min L, et al. Soybean defense responses to the soybean aphid [J]. New Phytologist, 2008, 179: 185-195.
- [11] 张晓波, 吴岩, 林红. 高效液相色谱测定水解大豆中异黄酮方法研究 [J]. 粮食与油脂, 2006(4): 19-21. (Zhang X B, Wu Y, Lin H. Study on method of hydrolyze isoflavones in soybean by HPLC [J]. Cereal & Oils, 2006(4): 19-21.)
- [12] 张大勇, 李文滨, 李冬梅, 等. 大豆叶片异黄酮含量与 PAL 基因相对表达量的关系 [J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 670-673. (Zhang D Y, Li W B, Li D M, et al. Relationship between the contents of soybean isoflavonones and relative expression quantity of PAL gene [J]. Soybean Science, 2009, 28(4): 670-673.)
- [13] 鞠兴荣, 袁建, 汪海峰. 高效液相色谱法测定大豆提取物中大豆异黄酮的含量 [J]. 中国粮油学报, 2000, 15(4): 26-29. (Ju X R, Yuan J, Wang H F. Determination of isoflavone in extract of soybean by HPLC [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2000, 15(4): 26-29.)
- [14] Rose U S, Tumlinson J H. Volatiles released from cotton plants in response to *Helicoverpa zea* feeding damage on cotton flower buds [J]. Planta, 2004, 218(5): 824-832.
- [15] 刘慧, 许再福, 黄寿山. 黄足黄守瓜 (*Aulacophora femoralis chinensis*) 取食和机械损伤对南瓜子叶中葫芦素 B 的诱导作用 [J]. 生态学报, 2007, 27(12): 5423-5426. (Liu H, Xu Z F, Huang S S. Comparing on the inducing cucurbitacin B content in cotyledon of squash aroused by *Aulacophora femoralis chinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae) and mechanical damage [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(12): 5423-5426.)