

利用抗坏血酸揭示小粒黑豆对胞囊线虫抗性的研究

马雪瑞¹,段玉玺¹,陈立杰¹,刘大伟¹,王媛媛²,朱晓峰¹

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:以抗感大豆胞囊线虫3号生理小种的小粒黑豆(ZDD1412)和辽豆10为试材,温室盆栽条件下人工接种大豆胞囊线虫,以未接种作对照,接种后7、14、21、28和35 d取样,测定大豆根内抗坏血酸含量和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的动态变化以及不同浓度抗坏血酸对大豆胞囊线虫胞囊孵化和二龄幼虫抑制率的影响。结果表明:抗病品种抗坏血酸含量大部分时间高于感病品种,接种试材抗坏血酸含量的变化幅度大于未接种对照;抗病品种APX活性均呈上升趋势,而感病品种接种和未接种的APX活性变化幅度较大。浓度为5、10和20 mg·L⁻¹的抗坏血酸对胞囊孵化的刺激效果最为显著;浓度为80 mg·L⁻¹的抗坏血酸对二龄幼虫的校正击倒率在不同处理时间上均大于其它浓度处理,均与无菌水对照达到了5%的显著水平。

关键词:大豆;大豆胞囊线虫;抗坏血酸(ASA);抗坏血酸过氧化物酶(APX)

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)01-0123-04

Revealing Resistance of Xiaoliheidou to Soybean Cyst Nematode by Ascorbic Acid

MA Xue-rui¹, DUAN Yu-xi¹, CHEN Li-jie¹, LIU Da-wei¹, WANG Yuan-yuan², ZHU Xiao-feng¹

(1. Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866; 2. Department of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

Abstract: Xiaoliheidou and Liaodou 10 were inoculated with the 3rd race of soybean cyst nematode (SCN) in greenhouse, they had different resistance to SCN. The development of Ascorbic acid(ASA) content and Ascorbate peroxidase(APX) activities were determined after inoculated for 7, 14, 28 and 35 days. The results showed that ASA content of resistant cultivar was higher than sensitive one and inoculated materials were higher than control; APX activities of Xiaoliheidou showed an upward trend. Meanwhile, studied the effects of ASA concentrations on SCN incubation and J₂, 80 mg·L⁻¹ ASA was more effective than other concentrations and was significantly different with sterile water at 5% level.

Key words: Soybean; *Heterodera glycines*; Ascorbic acid(ASA); Ascorbate peroxidase(APX)

大豆胞囊线虫病(Soybean Cyst Nematode,简称SCN),是由大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)侵染引起的,是危害世界大豆生产最严重的病害之一^[1]。该病害的特点为危害严重、分布广泛、传播途径多、寄主范围宽、休眠体(胞囊)存活时间长,是一种极难防治的土传病害。在我国东北和黄淮海大豆产区发生较普遍,一般大豆减产会达到5%~10%,严重的可达30%以上,甚至颗粒无收^[2]。大豆胞囊线虫是土传的定居性内寄生线虫,侵染植株根系,成为目前世界各国大豆生产中的主要难题,因此有关大豆胞囊线虫的研究越来越受到各国政府和科学家们的重视。

抗坏血酸(ASA)也称维生素C,是植物自身代谢过程中必不可少的物质,在植物的抗氧化作用、光合作用以及生长代谢等方面具有重要的生理作

用。抗坏血酸过氧化物酶(APX)是植物细胞中防御外界氧化胁迫和植物本身活性氧代谢的重要抗氧化酶类,在降低H₂O₂对植物细胞产生氧化损伤方面起关键作用^[3]。要使APX发挥正常的催化功能,及时清除H₂O₂维持叶绿体正常的功能,必须有ASA存在。目前对于大豆根内抗坏血酸代谢的研究还鲜有报道,分析抗性资源小粒黑豆抗坏血酸代谢的物质变化及其对大豆胞囊线虫的影响,以期揭示大豆胞囊线虫抗性的分子代谢机制及抗线育种工作提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试品种 高感品种辽豆10(农艺性状好,

收稿日期:2010-10-18

基金项目:国家现代农业产业技术体系资助项目;公益性行业(农业)科研专项(200903040-03)资助项目。

第一作者简介:马雪瑞(1985-),女,在读硕士,研究方向为植物线虫学。E-mail: maxuerui08044033@163.com。

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

植株高大,分枝数较多,产量较高)。

高抗品种小粒黑豆(国家编号 ZDD1412)(植株比较矮小,呈蔓生状,种皮黑色,产量较低)。

1.1.2 线虫 沈阳农业大学试验地感染大豆胞囊线虫 3 号生理小种地块,取样,分离,收集色泽、大小均一饱满的胞囊,4℃ 保存备用(保存时间不宜超过 7 d)。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆培养及接种 将供试大豆品种置于装有灭菌的蛭石穴盘中,放到温室中培养,期间及时浇水。取试验地的土壤于 165℃ 高温灭菌 2~3 h,冷却后,与砂土 1:2 混合,装在 16×16 cm 的黑色塑料营养钵中,待用。当胚根长至 4~5 cm 时,将性状均一的幼苗移栽至塑料钵中,每钵 3 株,播种大豆的同时接种线虫,将 20 粒胞囊进行组织破碎制成卵悬液在大豆根部进行接种,不同品种均设对照(不接种线虫),重复 3 次,做好标签,随机放置,置于温室内(20~25℃)培养,人工浇水(不宜过多)。

1.2.2 取样 分别于大豆接种 SCN 后 7、14、21、28 d 和 35 d 取样,每次每品种均随机取苗 3 株。具体方法为:用水浸湿土壤,扣盆时使根系在不受损伤的情况下,用水冲洗掉根系的泥土,剪去上部叶片,用蒸馏水漂洗根,用滤纸吸干水分,用锡箔纸包好样品,液氮速冻,用封口袋装好,做好标签,-80℃ 保存。

1.2.3 抗坏血酸浓度梯度的配备 称取 0.01 g 抗坏血酸(ASA)分析纯,加入 100 mL 的双蒸水,配制成浓度为 100 mg·L⁻¹的抗坏血酸母液,再用双蒸水按比例配制浓度为 0.5、10、20、40、60 和 80 mg·L⁻¹的抗坏血酸溶液。

1.2.4 抗坏血酸标准曲线的制作 参照《现代植物生理学实验指南》^[4]。配制 100 mL 浓度为 1 000 mg·L⁻¹的抗坏血酸母液,配制浓度为 0、20、40、60、80、120 和 140 mg·L⁻¹的标准液。取 7 支具塞试管,编号,依次加入不同浓度标准液 1 mL,然后每管加入 5% 的 TCA 1 mL 和无水乙醇 1 mL,摇匀,再加入 0.4% 正磷酸-乙醇 0.5 mL、0.5% BP-乙醇 1 mL、0.03% 氯化铁-乙醇 0.5 mL,最终每管总体积为 5 mL。将盛有反应液的试管置于 30℃ 下 90 min 后,在 760 nm 处测定 OD_{760 nm} 值。以 ASA 浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,以 OD_{760 nm} 值为纵坐标,绘制标准曲线。重复 5 次。

1.2.5 抗坏血酸(ASA)含量的测定 参照陈利锋等的方法,略有改动。准确称取 1 g 大豆根系样品置于预冷的研钵中,加入 2.0 mL 10% 三氯乙酸(TCA)溶液(内含 0.2 mmol·L⁻¹ EDTA)充分研磨

成匀浆,4℃ 下 10 000 r·min⁻¹离心 20 min,上清液用 50 mmol·L⁻¹ 草酸溶液(内含 0.2 mmol·L⁻¹ EDTA)定容至 5.0 mL,即为 ASA 提取液。量取 2.0 mL 提取液,加入草酸溶液 3.0 mL、偏磷酸-乙酸溶液 0.5 mL(配制方法为 1.5 g 偏磷酸+4.0 mL 乙酸+20 mL H₂O,加热促溶,定容至 50 mL)、5% 硫酸溶液 1.0 mL、5% 钼酸铵溶液 2.0 mL,定容至 20 mL,静置 15 min 后测定 OD₇₆₀ 值,根据 ASA 标准曲线计算样品的 ASA 含量。样品 ASA 含量的测定公式为:

$$\text{样品 ASA 含量}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \text{标准曲线查得的抗坏血酸量}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{稀释倍数} \times \text{提取液体积}(\text{mL}) / \text{样品重量}(\text{g})$$

1.2.6 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定 参照沈文彪等^[6]的测定方法,略有改动。准确称取 1 g 大豆根系样品置于预冷的研钵,按 1:3(W/V)加入 1.5 mL 预冷的提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲液,pH 7.8;内含 2 mmol·L⁻¹ ASA;5 mmol·L⁻¹ EDTA)冰浴充分研磨,4℃ 下 12 000 r·min⁻¹离心 20 min,上清液即为酶提取液,待用。在洁净的试管中加入 3 mL 反应液(50 mmol·L⁻¹ PBS,pH 7.0;0.1 mmol·L⁻¹ EDTA-Na₂、0.32 mmol·L⁻¹ ASA、0.06 mmol·L⁻¹ H₂O₂),再加入 0.1 mL 酶液,迅速颠倒混匀。用 1 cm 比色杯在 290 nm 处测定 1 min 内 OD₂₉₀ 值变化,每 10 s 连续记录室温下 OD₂₉₀ 值,以不加 ASA 和 H₂O₂ 作为空白对照。室温下每分钟每克鲜重氧化 1 μmol ASA 的酶量作为一个酶活性单位(U),酶活力以 OD₂₉₀·min⁻¹·g⁻¹ FW 表示。

1.2.7 不同浓度抗坏血酸对胞囊孵化的影响 从沈阳农业大学感染大豆胞囊线虫 3 号生理小种的试验地土样中,采用淘洗过筛法分离新鲜胞囊。选取大小均一、成熟度一致的胞囊,先用 0.05% NaClO 溶液消毒 3 min,再用无菌水冲洗数次后放入贝氏小皿中,每皿 10 粒胞囊,加入 1 mL 浓度为 0.5、10、20、40、60 和 80 mg·L⁻¹的抗坏血酸溶液,以无菌水作对照,25℃ 下孵化,每隔 12 h 镜检并记录 5 d 内孵化出的二龄幼虫,每处理重复 3 次。

1.2.8 不同浓度抗坏血酸对大豆胞囊线虫击倒率的测定 取灭菌的贝氏小皿,内盛 40 条二龄幼虫,分别加入 1 mL 不同浓度的抗坏血酸溶液,以双蒸水作对照,每个处理重复 3 次。在 12、24、36、48、60、72 和 84 h 镜检并记录供试线虫总数和死亡数,并计算线虫击倒率和校正击倒率,虫子僵直且不动的线虫视为击倒,不做最终刺激。

$$\text{线虫击倒率}(\%) = (\text{击倒线虫数} / \text{供试线虫数}) \times 100$$

校正击倒率(%) = (处理线虫击倒率 - 对照线虫击倒率) / (1 - 对照线虫击倒率) × 100

所得数据经 DPS2000 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 抗坏血酸标准曲线的制作

在 760 nm 处测定浓度为 0、20、40、60、80、120、140 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸标准液,其 5 次重复 OD_{760nm} 平均值依次为 0、0.0291、0.0563、0.0831、0.1069、0.1648 和 0.1922。以 ASA 浓度 (mg · L⁻¹) 为横坐标,以 OD_{760nm} 值为纵坐标,绘制标准曲线为 $Y = 0.0136X + 0.0008$, $R^2 = 0.9996$ 。

2.2 抗坏血酸(ASA)含量的测定

从图 1 可以看出,小粒黑豆和辽豆 10 的未接种对照根内 ASA 含量变化趋势相反,抗病品种在第 14 天达到峰值,随着大豆的生长逐渐降低,而感病品种结果相反。在接种大豆胞囊线虫的条件下,抗病品种小粒黑豆和感病品种辽豆 10 根内 ASA 含量变化趋势基本一致,且在第 21 天根内 ASA 含量均达到峰值,小粒黑豆根内 ASA 含量是辽豆的 1.95 倍,是未接种对照的 3.23 倍。结果表明根内 ASA 含量与大豆抗大豆胞囊线虫有一定的相关性,根内高含量的 ASA 不利于大豆胞囊线虫的侵入。

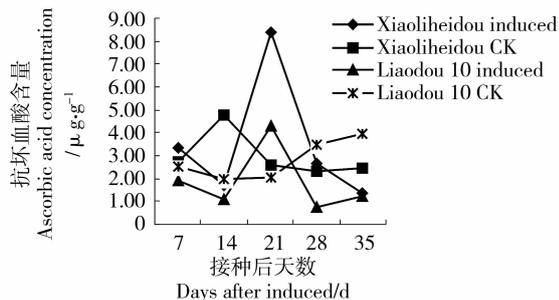


图 1 受 SCN 侵染后抗感品种根内抗坏血酸含量变化
Fig. 1 Changes of ascorbic acid concentration in different resistant soybean cultivars roots after inoculated by *H. glycines*

2.3 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性

从图 2 可以看出,抗感品种无论接种还是未接种,在第 35 天 APX 活性均达到峰值。小粒黑豆接种大豆胞囊线虫后,根内 APX 活性高于对照,且活性变化趋势与对照基本一致,随大豆生长逐渐升高。接种条件下的辽豆 10 在第 14 天到峰值,随后呈先降低再升高趋势,而对照在第 14 天达到最低值,随后呈迅速升高再平稳升高。受大豆胞囊线虫侵染后植物细胞膜系统因氧自由基积累而被破坏,APX 能够及时高效地清除活性氧^[7]。接种的辽豆

10 在第 14 天最先升高,说明其体内氧自由基积累过多,膜系统遭受破坏最快,APX 活性迅速升高防御植物细胞外界氧化胁迫,而其对照和抗病品种则逐渐升高。所以,抗坏血酸过氧化物酶的活性变化与大豆抗胞囊线虫有一定的相关性。

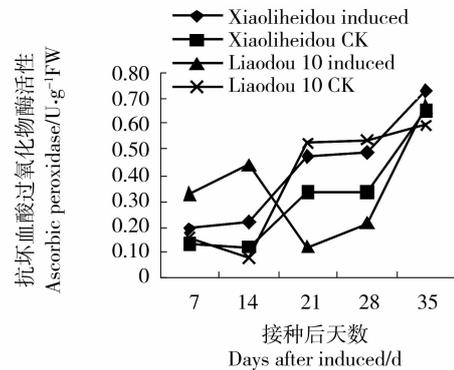


图 2 受 SCN 侵染后抗感品种根内抗坏血酸过氧化物酶活性变化
Fig. 2 Changes of APX in different soybean cultivars roots after inoculated by *H. glycines*

2.4 不同浓度抗坏血酸对胞囊孵化的影响

从图 3 可以看出,不同浓度的抗坏血酸溶液对胞囊孵化有不同的作用。浓度为 5、10、20 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸对胞囊孵化有刺激作用,80 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸对胞囊孵化有抑制作用。其中 5 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸对胞囊孵化的刺激作用最为显著,80 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸的抑制作用最大,84 h 时前者孵化线虫数是后者的 30 倍,是对照的 8.7 倍。

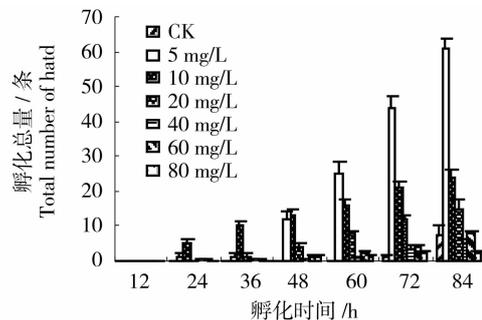


图 3 不同浓度抗坏血酸溶液对胞囊孵化的影响
Fig. 3 Effect of ascorbic acid at different concentration on hatching of SCN

2.5 抗坏血酸对大豆胞囊线虫击倒率的影响

从表 1 可知,浓度为 80 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸对 J₂ 的校正击倒率在不同处理时间上均大于其它浓度处理,均与双蒸水对照达到了 5% 的显著水平。除 24 和 36 h 外,5 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸均低于双蒸水对照且达到了 5% 的显著水平。在 84 h 时 80 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸对 J₂ 的校正击倒率达到了 79.10%,是无菌水对照的 1.9 倍,是 5 mg · L⁻¹ 的抗坏血酸的 4.74 倍。

表 1 不同浓度抗坏血酸溶液对大豆胞囊线虫二龄幼虫抑制率的影响

Table 1 Effect of ascorbic acid at different concentration on juveniles of *H. glycines*

浓度 Concentration/mg · L ⁻¹	处理时间 Treatment time/h						
	12	24	36	48	60	72	84
CK	0.00Bc	7.01Bb	9.65Bb	14.03BbCc	22.81Bbc	29.83ABbCc	41.23ABbed
5	3.13Bbc	3.09Bb	4.51Bb	-3.00Cc	2.84Be	13.91Cc	16.70Bd
10	4.76Bbc	1.67Bb	6.18Bb	12.47BbCc	18.56Bbc	21.29BbCc	36.80Abcd
20	8.11Bbc	7.95Bb	15.24Bb	27.69AaBb	31.14ABb	47.36AaBbC	54.01AaBbc
40	9.52Bb	8.84Bb	14.62Bb	14.69ABbCc	27.21Bb	47.08AaBbC	64.35AaBbc
60	11.40Bb	11.31Bb	16.50Bb	21.43ABbC	34.08ABb	61.26AaB	74.63Aab
80	30.70Aa	37.74Aa	47.57Aa	52.04Aa	61.37Aa	70.01Aa	79.10Aa

表 1 数据均为 3 次重复平均值。同列数据后不同小写字母表示在 5% 水平时差异显著,不同大写字母表示在 1% 水平时差异显著 (Duncan's 新复极差检验)。

Data are average of 3 replications in Table 1. Values within the same column follow by different capital and lower case letters are significantly different at 0.01 and 0.05 probability level, respectively (Duncan's new multiple range test).

3 结论与讨论

在植物与病原物的共同进化、相互作用和识别的过程中,形成了高度复杂的关系;线虫寄生在植物上对植物造成一定的伤害,同时寄主植物也对线虫产生了多种抗性机制的协同作用^[8]。关于抗坏血酸与抗病性的关系,目前说法各有不同^[9]:其一认为 ASA 有利抗病且发现抗病品种的组织中有 ASA 积累,感染后高感品种所含的 ASA 含量很少;第二种观点认为 ASA 可抑制植株抗病性的表达,感病品种体内积累较高量的 ASA;第三种意见认为 ASA 与植物抗/感病性无关。抗坏血酸过氧化物酶是清除 H₂O₂ 抗坏血酸-谷胱甘肽 (ASA-GSH) 循环系统的关键酶,ASA 可直接与活性氧反应而将其还原,又可作为 APX 的底物在活性氧的清除过程中起作用^[10]。

研究结果发现,在大豆与大豆胞囊线虫互作过程中 ASA 含量、APX 活性与抗性有明显的相关性。在接种的条件下抗病品种小粒黑豆 APX 活性高于未接种对照和感病品种辽豆 10,而感病品种辽豆 10 呈现 APX 活性持续升高有可能是因为随着底物 ASA 含量升高而调节 APX 活性。APX 一大特点是在 ASA 缺乏时其活性不稳定,当 ASA 浓度低于 20 μmol · L⁻¹ 时 APX 活性迅速丧失^[11],这不仅表明 ASA 可以调节 APX 活性,而且再次为 ASA 作为植物重要抗氧化剂提供了证据。总的来说,小粒黑豆抗线水平与 APX 活性呈正相关性,在抗线过程中 APX 的作用可能是通过调节 ASA 含量而实现的。

参考文献

[1] 王金陵. 大豆[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1982:260-266. (Wang J L. Soybean[M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1982:260-266.)

[2] 刘维志,刘晔,段玉玺,黄,淮,海地区大豆种植资源对大豆胞囊线虫 1 号生理小种的抗性鉴定研究[J]. 大豆科学,1991,10(4):327-329. (Liu W Z, Liu Y, Duan Y X. Test of soybean germplasm from Huang, Huai and Hai river valley for resistance to race

1 of soybean cyst nematode[J]. Soybean Science, 1991, 10(4): 327-329.)

[3] 李惠华,赖钟雄. 植物抗坏血酸过氧化物酶研究进展[J]. 亚热带植物科学,2006, 35(2):66-69. (Li H H, Lai Z X. A review of progress in ascorbate peroxidase in plants[J]. Subtropical Plant Science, 2006, 35(2): 66-69.)

[4] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999. (Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Plant Physiology. Modern Plant Physiology Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 1999.)

[5] 陈利锋,叶茂炳,陈永幸,等. 抗坏血酸与小麦抗赤霉病性的关系[J]. 植物病理学报,1997,27(2):113-118. (Chen L F, Ye M B, Chen Y X, et al. The relationship between ascorbic acid and resistance of wheat to SCAB [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(2): 113-118.)

[6] 沈文彪,徐朗莱,叶茂炳,等. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨[J]. 植物生理学通讯,1996,32(3):203-205. (Shen W B, Xu L L, Ye M B, et al. Study on determination of ASP activity[J]. Plant Physiology Communications, 1996, 32(3): 203-205.)

[7] 张维静,陆海,杜希华. 抗坏血酸过氧化物酶在植物抵抗氧化胁迫中的作用[J]. 山东师范大学学报(自然科学版),2008,23(4):113-115. (Zhang W J, Lu H, Du X H. The function of ascorbate peroxidases in plant resistance to oxidative stress[J]. Journal of Shandong Normal University (Natural Science), 2008, 23(4): 113-115.)

[8] 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,2001,20(4):285-289. (Wu H Y, Yuan F, Chen L J, et al. Advances in soybean cyst nematode and mechanism of soybean resistance to *Heterodera glycines* [J]. Soybean Science, 2001, 20(4): 285-289.)

[9] 宋海超. 水稻抗瘟性的生化机制研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2003:46-47. (Song H C. Studies on the bio-chemistry mechanisms of rice blast resistance[D]. Haikou: Tropical Agricultural University Of South China, 2003:46-47.)

[10] 孙卫红,王伟青,孟庆伟. 植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):143-147. (Sun W H, Wang W Q, Meng Q W. Functional mechanism and enzymatic and molecular characteristic of ascorbate peroxidase in plants [J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41(2): 143-147.)

[11] Shiegeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, et al. Regulation and function of Ascorbate Peroxidase isoenzymes [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 372: 1305-1319.