

## 休眠期大豆胞囊线虫体内关键酶活性变化

郑雅楠<sup>1</sup>, 陈 乐<sup>2</sup>, 陈井生<sup>3</sup>, 王媛媛<sup>2</sup>, 段玉玺<sup>2</sup>, 陈立杰<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866; 3. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316)

**摘要:**大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*, SCN)病是一种重要的大豆病害,以休眠胞囊越冬。为明确休眠期 SCN 的生理代谢变化,采用分光光度计测定了休眠期 SCN 体内几种关键酶活性。结果表明:海藻糖酶(trehalase, TRE)、糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)、山梨醇脱氢酶(NAD-sorbitol dehydrogenase, NAD-SDH)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶(pyruvate, PK)和果糖 1,6-二磷酸羧醛酶(fructose 1,6-bisphosphatase, FBP)均与 SCN 休眠密切相关,进入休眠 SCN 体内海藻糖酶活性迅速升高,糖原磷酸化酶活性也显著升高,有利于海藻糖所需碳源的供给,而磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、果糖 1,6-二磷酸羧醛酶和山梨醇脱氢酶 4 种酶活性均显著降低,休眠解除后活性回升。

**关键词:**大豆胞囊线虫;休眠;酶;活性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)04-0526-04

## Changes of Related Enzyme Activities in Dormant Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines*

ZHENG Ya-nan<sup>1</sup>, CHEN Le<sup>2</sup>, CHEN Jing-sheng<sup>3</sup>, WANG Yuan-yuan<sup>2</sup>, DUAN Yu-xi<sup>2</sup>, CHEN Li-jie<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 3. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

**Abstract:** Soybean cyst nematode (SCN) disease (*Heterodera glycines*), which is a major disease of soybean, overwinters in its dormant stage. In order to find out the physiological metabolism of dormant SCN, the activities of dormancy-related enzymes, including trehalase (TRE), glycogen phosphorylase (GP), NAD-sorbitol dehydrogenase (NAD-SDH), phosphofructokinase (PFK), pyruvate (PK) and fructose 1,6-bisphosphatase (FBP), were assayed in dormant SCN during different dormancy stage by spectrophotometer. The result showed that activities of these enzymes were closely related to dormancy of SCN, significantly increasing of TRE and GP activities when SCN entered into dormant stage, favored to supply of carbon source needed by TRE. But the activity of PFK, PK, FBP and NAD-SDH in dormant SCN were obviously lower than active SCN, then went up after dormancy broken.

**Key words:** *Heterodera glycines*; dormancy; enzyme; activity

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*, Soybean cyst nematode, SCN)病是威胁世界大豆生产的重要病害之一。由于 SCN 进化程度较高,在冬季以胞囊形式进行休眠以度过寒冷低温,翌年春天继续传播感染,使该病害难于防治<sup>[1]</sup>。

SCN 的休眠是一种极为复杂的生命活动,至今相关机制也尚未探明,推测它除了受温度、光照等外界因素的影响以外,与其体内物质代谢也有密切的联系<sup>[2]</sup>。在昆虫滞育的研究中发现一些酶活性变化与滞育有关,如海藻糖酶<sup>[3]</sup>、脂酶 A<sup>[4]</sup>、山梨醇脱氢酶<sup>[5]</sup>、糖代谢酶(丙酮酸激酶 PK、乳酸脱氢酶 LDH)以及过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等保护酶<sup>[6-7]</sup>。其中海藻糖酶和山梨醇脱氢酶被认为是滞育起始和终止阶段的 2 个关键性酶<sup>[3,8]</sup>;海藻糖酶

是昆虫滞育激素调控过程中的关键酶,诱导卵滞育<sup>[8]</sup>;山梨醇脱氢酶是昆虫滞育解除过程中的关键酶<sup>[3]</sup>;酯酶 A4 被称为家蚕滞育生物钟蛋白质<sup>[8]</sup>。关于线虫休眠期体内酶活性变化的研究较少,小卷蛾斯氏线虫在脱水休眠后酯酶活性降低<sup>[9]</sup>,大豆胞囊线虫的滞育与脂酶和海藻糖酶的活性相关<sup>[10]</sup>。本研究对休眠 SCN 体内几种重要酶的活性变化进行了研究,以期揭示 SCN 休眠生理机制提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试线虫

土样采集自沈阳农业大学大豆田,采集时间为 8 月至次年 5 月,5、8、9 月从田间直接采集土壤,10

收稿日期:2013-04-17

基金项目:现代农业产业技术体系资助项目(CARS-04);农业部公益性行业(农业)科研专项(200903040-03)。

第一作者简介:郑雅楠(1980-),女,博士,讲师,主要从事植物线虫学研究。E-mail:rockyya@163.com。

通讯作者:段玉玺(1964-),男,教授,主要从事植物线虫学研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

月收集大量土壤分装成 7 份置于室外保存,从 10 月至次年 4 月,每月从室外取 1 份分装好的土样,用淘洗过筛法分离胞囊。

## 1.2 酶的制备与测定

**1.2.1 海藻糖酶(TRE)** 取胞囊 0.01 g,加入预冷的 PBS 缓冲液( $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.8)在冰上研磨,加入 50  $\mu\text{L}$  海藻糖标准液,37℃ 加热 30 min,沸水浴 2~3 min,冰浴冷却后,加入 90  $\mu\text{L}$  海藻糖酶显色剂(1 g 3,5-二硝基水杨酸,1 g NaOH,0.2 g 苯酚和 0.05 g 无水亚硫酸钠定容至 100 mL)90℃ 加热 5 min,冰浴冷却后,加入 60  $\mu\text{L}$  40% 酒石酸钾钠溶液,混匀后于 550 nm 波长下测定吸光值。每个处理设 3 次重复。

**1.2.2 糖原磷酸化酶(GP)、山梨醇脱氢酶(NADSDH)、磷酸果糖激酶(PFK)、丙酮酸激酶(PK)和果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(FBP)** 酶的提取:取胞囊 0.01 g,加入 50  $\mu\text{L}$  预冷的酶提取液( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  咪唑,30% 甘油,  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  巯基乙醇, pH 7.2)在冰上用研磨,4℃  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,将滤液于 4℃  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min,上清液作为酶粗提液置于冰上备用。

酶的测定:反应体系参照吴大洋等<sup>[11]</sup>的方法配

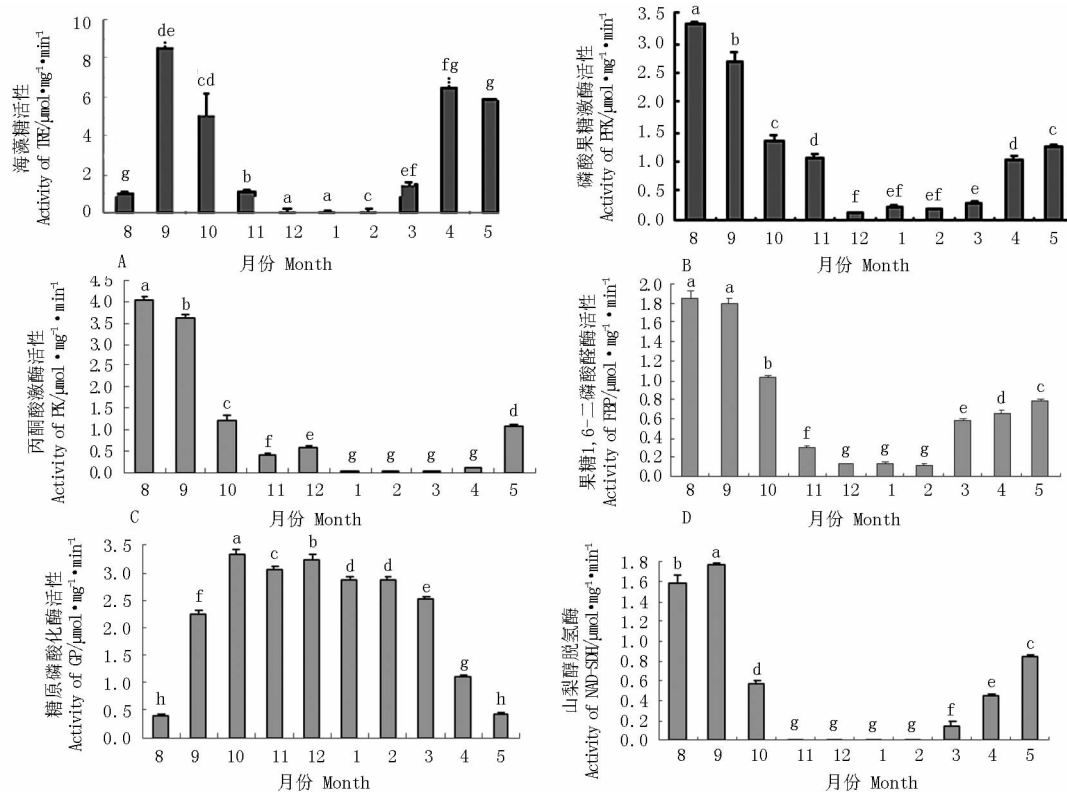
制,在反应液中加入 100  $\mu\text{L}$  酶粗提液,反应终体积为 1 mL,测定 340 nm 下的吸光值,每次测定 30 s,共测定 10 次,取均值,3 次重复。

酶蛋白的定量:每个反应取 10  $\mu\text{L}$  粗酶液,采用 Bradford<sup>[12]</sup>的方法进行蛋白质含量测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 休眠期 SCN 体内酶活性

由图 1 可见,SCN 胞囊的海藻糖酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶和山梨醇脱氢酶活性变化趋势相似,从休眠前到休眠末期的各月差异显著,进入休眠后活性都明显下降,随着休眠的深入活力降低,从 3 月起又升高。其中胞囊内海藻糖酶活性 9 月最高,12 月和 1 月最低,几乎检测不到活性;磷酸果糖激酶活性 8 月最高,12 月最低;丙酮酸激酶的活性同样在 8 月最高,1 月至 3 月降至最低;果糖 1,6-二磷酸醛缩酶活性 8 月最高,2 月最低;山梨醇脱氢酶活性 9 月最高,11 月至次年 2 月最低。与以上几种酶活性变化趋势不同,糖原磷酸化酶活性总体上呈先升高再降低的变化趋势,8 月活性最低,10 月活性最高。



图中不同字母表示经 Duncan 氏新复极差检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。

Different letters are significantly different at  $P < 0.05$  level with Duncan's multiple range test.

图 1 休眠期囊关键酶活性动态变化

Fig. 1 Eenzyme activity of dormant cyst

## 2.2 不同休眠阶段 SCN 体内酶活性比较

由表 1 可以看出,除糖原磷酸化酶之外,其余 5 种酶活性在 SCN 休眠各阶段变化明显,且活性都在休眠期最低,显著低于其他 2 个时期;磷酸果糖激酶-丙酮酸激酶-果糖 1,6-二磷酸羧醛酶和山梨醇脱

氢酶活性在未进入休眠时期最高,而海藻糖酶活性在休眠末期最高。然而,糖原磷酸化酶在休眠期的活性显著高于未休眠期和休眠末期,并且在未休眠期和休眠末期的活性差异不显著。

表 1 休眠期不同阶段胞囊内酶活性变化

Table 1 Enzyme activity of different stages of dormant cyst ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )

不同阶段 Different stage	海藻糖酶 TRE	磷酸果糖激酶 PFK	丙酮酸激酶 PK	果糖 1,6-二磷酸羧醛酶 FBP	糖原磷酸化酶 GP	山梨醇脱氢酶 NAD-SDH
未休眠 Prophase of dormancy	5.85 ± 0.10 b	3.31 ± 0.06 a	4.04 ± 0.09 a	1.85 ± 0.06 a	0.39 ± 0.02 b	1.58 ± 0.08 a
休眠期 Dormant period	2.94 ± 0.20 c	0.87 ± 0.02 c	0.75 ± 0.03 c	0.59 ± 0.00 c	2.65 ± 0.03 a	0.37 ± 0.01 c
休眠末期 The end of dormant period	6.01 ± 0.06 a	1.26 ± 0.02 b	1.06 ± 0.06 b	0.78 ± 0.02 b	0.41 ± 0.03 b	0.85 ± 0.01 b

表中数据为 3 次重复的平均数 ± 标准差,不同字母表示经 Duncan 氏新复极差检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。

All data in table are mean ± SE of 3 replicates, different letters are significantly different at  $P < 0.05$  level with Duncan's multiple range test.

## 3 讨 论

海藻糖酶、糖原磷酸化酶、山梨醇脱氢酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶和果糖 1,6-二磷酸羧醛酶在糖原与多元醇的代谢反应中是必不可少的<sup>[13]</sup>,许多研究都报道了这些酶与昆虫的滞育过程有关,本研究也证实他们均与 SCN 休眠密切相关。

海藻糖酶是昆虫滞育关键酶<sup>[3]</sup>,本试验中,进入休眠前 SCN 体内海藻糖酶活性迅速升高,将过量的海藻糖转化为抗逆作用的碳水化合物(甘油、糖原等);而在休眠期间海藻糖酶活性急剧降低有助于海藻糖的积累,帮助 SCN 抵御不良的环境条件。

进入休眠后糖原磷酸化酶活性也显著升高,有利于海藻糖所需碳源的供给,这与 SCN 在休眠期海藻糖维持较高水平的结果相吻合,同时对昆虫滞育的研究结果一致<sup>[14]</sup>。同时,休眠期间糖原磷酸化酶活性较高,能够确保抗冻保护性物质甘油和山梨醇的积累<sup>[15]</sup>;休眠解除后糖原磷酸化酶的活性降低,说明 SCN 恢复活动后,需要较多的糖原以满足正常发育所需的能量供给。

磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶和果糖 1,6-二磷酸羧醛酶是糖酵解途径中的重要酶,磷酸果糖激酶和果糖 1,6-二磷酸羧醛酶与甘油的生成以及葡萄糖、果糖的分解利用有直接关系<sup>[11]</sup>。在糖酵解途径中,无论是糖原的直接分解利用还是山梨醇转化而来的 6-磷酸果糖,都必须经磷酸果糖激酶作用生成 1,6-二磷酸果糖,最终被分解利用。本研究结果表明,休眠胞囊的磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、果糖 1,6-二磷酸羧醛酶活性均显著降低,休眠末期回升。这说明在 SCN 休眠阶段生命活动处于停滞阶段,糖酵解代谢途径被抑制,同时山梨醇积累能力增强以保证其安全越冬,休眠一旦结束各种酶活性升高,

以维持 SCN 各项生命活动所需的物质和能量供给。

山梨醇脱氢酶是山梨醇的分解及糖原再合成的关键酶<sup>[16]</sup>,其活性与昆虫的滞育密切相关<sup>[17]</sup>,本研究中,该酶在休眠期活性都明显低于其他 2 个时期,说明 SCN 在休眠期间山梨醇积累能力增强,以帮助其越冬。

## 参考文献

- [1] Duan Y X, Zheng Y N, Chen L J, et al. Effects of abiotic environmental factors on soybean cyst nematode[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, (8)3:317-325.
- [2] 李秀侠, 吴海燕, 时立波, 等. 大豆胞囊线虫白色胞囊与褐色胞囊几种代谢物质比较[J]. 大豆科学, 2008, 27(2):283-287. (Li X X, Wu H Y, Shi L B, et al. Comparative studies on etabolites in white and brown cyst of *Heterodera glycines* race4[J]. Soybean Science, 2008, 27(2):283-287.)
- [3] 王洪亮, 仵均祥, 王丙丽. 麦红吸浆虫滞育期间海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性的变化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(8):139-142. (Wang H L, Wu J X, Wang B L. Changes of trehalase and sorbitol dehydrogenase activity in the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) during mature and diapause stage[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science), 2006, 34(8):139-142.)
- [4] 徐世清, 戴璇颖, 韩益飞, 等. 家蚕滞育生物钟蛋白质酯酶 A4 研究进展[J]. 蚕学通讯, 2000, 20(4):9-15. (Xu S Q, Dai X Y, Han Y F, et al. Advance of diapause biological clock protein esterase A4 of *Bombyx mori* [J]. Sericology Bulletin, 2000, 20(4):9-15.)
- [5] 陈田飞, 乐波灵. 家蚕滞育机理研究概况[J]. 广西蚕业, 2004, 41(3):12-16. (Chen T F, Yue B L. Research of diapause mechanism of *Bombyx mori* [J]. Guangxi Sericulture, 2004, 41(3):12-16.)
- [6] 范兰芬, 钟杨生, 林建荣. 家蚕滞育卵与非滞育卵中几种关键酶活性的比较[J]. 昆虫学报, 2011, 54(11):1258-1263. (Fan L F, Zhong Y S, Lin J R. Comparison of related enzyme activities between diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx*

- mori[J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(11): 1258-1263. )
- [7] 徐卫华. 昆虫滞育研究进展[J]. 昆虫学报, 1999, 42(1): 100-107. (Xu W H. Advances in insect diapause[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 1999, 42(1): 100-107. )
- [8] 王玉军, 徐世清, 司马杨, 等. 家蚕滞育生物钟蛋白质 EA4 基因的 cDNA 克隆和序列分析[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1): 36-42. (Wang Y J, Xu S Q, Sima Y, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA of diapause biological clock protein esterase A4 of *Bombyx mori*[J]. Sericultural Science, 2007, 33(1): 36-42. )
- [9] 陈松笔, 杨怀文, 蒋书楠. 脱水休眠小卷蛾斯氏线虫的生化特性研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7(1): 30-34. (Chen S B, Yang H W, Jiang S N. Studies on the biochemical characters of *Steinernema carpocapsae* BJ in anhydrobiosis[J]. Acta Parasitologica Et Medical Entomologica Sinica, 2000, 7(1): 30-34. )
- [10] 于浩, 吴海燕. 植物寄生线虫滞育机制研究进展[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 20-23. (Yu H, Wu H Y. Research progresses in the mechanism of dormancy and diapause in plant parasitic nematodes[J]. Plant Protection, 2009, 35(4): 20-23. )
- [11] 吴大洋, 向仲怀, 古泽寿治. 合成滞育激素对家蚕卵 Gpase、NAD-SDH、PFK、FBP 活性的影响[J]. 蚕学通讯, 2002, 22(3): 1-6. (Wu D Y, Xiang Z H, Furusawa T. Effects of a synthesized diapause hormone on the activities of Gpase, NAD-SDH, PEK and FBP in Silkworm (*Bombyx Mori*) eggs[J]. Newsletter of Sericultural Science, 2002, 22(3): 1-6. )
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [13] Yamashita O, Yaginuma T. Silkworm eggs at low temperature, implications for sericulture[M]// Lee R E, Denlinger D L. Insect at low temperature. New York: Chapman and Hall Press, 1991, 424-445.
- [14] 成卫宁, 李修炼, 李怡萍, 等. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析[J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 133-139. (Cheng W N, Li X L, Li Y P et al. Activities of four sugar metabolic enzymes in *Sitotiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages[J]. Acta Entomologica Sinica, 2009, 52(2): 133-139. )
- [15] Joannisse D R, Storey K B. Enzyme activity profiles in an overwintering population of freeze-tolerant larvae of the gall fly, *Eurosta solidaginis*[J]. Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental, 1994, 164: 247-255.
- [16] Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. Activity of NAD-sorbitol dehydrogenase is caused by biosynthesis of enzyme protein in diapause and non-diapause eggs of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1992, 103B: 657-661.
- [17] 王艇. 山梨醇脱氢酶作用机制及其与滞育的关系[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(15): 39-40, 84. (Wang T. The catalytic mechanism of sorbitol dehydrogenase and its role in the process of diapause of different species[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2012, 18(15): 39-40, 84. )

## 第九届全国大豆学术讨论会在武汉成功召开

2013 年 5 月 25 ~ 28 日, 由中国作物学会大豆专业委员会主办, 中国农业科学院油料作物研究所承办的“第九届全国大豆学术讨论会”在武汉召开。来自国内 105 家科研院所、高等院校、管理部门、推广机构、种业公司、仪器设备公司、生物试剂公司、期刊编辑部及澳大利亚联邦科学院植物研究所的 400 余位代表参加了会议。与会代表就大豆产业及科技发展战略、种质资源研究与利用、遗传育种、分子生物学、病虫害防治、栽培技术、生产机械和产品加工等学科研究进展及发展趋势开展了广泛交流及深入研讨。

本次学术讨论会上, 南京农业大学盖钧镒院士、大豆产业协会刘登高副会长、中国农业科学院油料作物研究所王汉中所长、华中农业大学张忠明教授和澳大利亚联邦科学院植物研究所杨爱军博士分别就“作物育种家的任务与思考”、“全球大豆产业与中国角色”、“我国油料产业形势分析与对策建议”、“豆科植物共生信号途径及调控的分子机制”、“澳大利亚大豆改良研究概况”作大会特邀报告。董钻、李英慧等 11 位代表作大会报告, 王曙明、杜维广等 40 位代表在分组会上作报告。36 位大豆青年科技人员在青年论坛上作报告。上海交通大学肖亮博士和中国农业科学院作物科学研究所郭勇博士的论文“两个夏大豆抗蚜虫基因的遗传分析与精细定位”和“大豆中等位基因发掘与功能标记开发应用研究”被评为青年优秀论文一等奖, 9 位青年代表的论文获得青年优秀论文二、三等奖。此次会议的召开, 对推进中国大豆产业科技创新, 支撑大豆生产持续发展, 保障国家食用油安全具有十分重要的意义。

陈海峰, 周新安

(中国农业科学院油料作物研究所)