

大豆不同品种根内类黄酮提取物对大豆胞囊线虫的抑制作用

段玉玺¹, 李海燕^{1,2}, 陈立杰¹, 陈井生^{1,3}

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院/北方线虫研究所, 辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163316; 3. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163313)

摘要: 以对大豆胞囊线虫表现不同抗性的五寨黑豆(抗)和合丰35(感)为材料, 利用乙醇为有机溶剂, 提取大豆根内类黄酮化合物, 测定类黄酮提取物对大豆胞囊线虫卵的孵化及J2幼虫的杀线活性。结果表明: 大豆不同品种根内类黄酮粗提物对大豆胞囊线虫卵的孵化、J2幼虫均有一定的抑制作用。处理24、48和72 h后, 五寨黑豆对卵孵化的抑制率比合丰35分别提高12.76%、9.03%和9.37%。处理48 h, 合丰35的校正死亡率比五寨黑豆增加7.0%。抗、感品种根内类黄酮提取物对大豆胞囊线虫J2的生理毒性结果表明: 抗、感病品种根内类黄酮提取物均可有效抑制大豆胞囊线虫体内蛋白质和糖的含量。对蛋白质含量的抑制率分别为57.07%和17.60%; 对糖含量的抑制率分别为13.75%和8.20%, 五寨黑豆显著高于合丰35。

关键词: 大豆根; 大豆胞囊线虫; 类黄酮提取物; 蛋白质; 糖

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0724

Inhibitory Effects of Flavonoids Extracted from Different Soybean Root on *Heterodera glycines* Ichinohe

DUAN Yu-xi¹, LI Hai-yan^{1,2}, CHEN Li-jie¹, CHEN Jing-sheng^{1,3}

(1. Nematology Institute of Northern China/Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Agricultural College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163316, China; 3. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

Abstract: Two cultivars with different resistance to *Heterodera glycines*, Wuzhaiheidou (resistant) and Hefeng 35 (susceptible) were selected as materials to extract flavonoids in root by ethanol as organic solvent. The nematocidal activity of flavonoids extraction on the hatchability of cysts and the activity of J2 were determined. The results showed that flavonoids extracted from different varieties could effectively inhibit *Heterodera glycines* eggs hatched and kill J2. The inhibiting of Wuzhaiheidou flavonoids extraction increased 12.76%, 9.03% and 9.37% more than Hefeng 35 when treated for 24, 48 and 72 h. Treating 48 h, revised mortality of Hefeng 35 flavonoids extraction on J2 increased 7.0% than Wuzhaiheidou. The results of physiological toxicity of two varieties flavonoids extraction showed that: the flavonoids extraction of resistant and susceptible varieties could inhibit the glucose and protein content of *Heterodera glycines*. The inhibition of protein content were 57.07% and 17.60%, respectively. The inhibition of glucose content were 13.75% and 8.20%, respectively.

Key words: Soybean root; *Heterodera glycines* Ichinohe; Flavonoids extraction; Protein; Glucose

大豆胞囊线虫病(soybean cyst nematode, SCN)是由大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)感染引起的,是世界大豆生产上危害最严重的病害之一,可引起的产量损失为5%~10%,严重地块可达30%以上,甚至绝产^[1]。由于大豆胞囊线虫属专性的内寄生线虫,其寄主范围较宽,胞囊可以在土壤中长期存活,因此该病的防治较为困难。有关大豆不同品种的抗线虫机制研究较多,相关研究发现,根系分泌物、类黄酮、酚类等次生代谢物质与大豆的抗病性有一定的相关性^[2-5]。

类黄酮是一种广泛存在于植物体内的次生代

谢产物,本身具有较强的抗氧化活性,可捕捉活性氧自由基,降低氧化伤害,是植物体内重要的抗氧化成分^[6],其作为具杀线虫活性的物质也已被广泛研究和利用。Marban等^[7]研究发现豆科植物的豆荚中含有植物凝集素对南方根结线虫有毒杀作用。但由于作物种类、作物品种及生育时期的不同或环境条件变化,往往也会影响作物的次生物质代谢。大豆胞囊线虫主要危害地下根部,不同品种对胞囊线虫的反应差异较大。为此,在前人研究的基础上,通过提取不同抗、感大豆胞囊线虫品种的大豆根内类黄酮进行杀线虫活性研究,旨在探索抗、感

收稿日期:2014-02-16

基金项目:农业部公益性行业科研专项(201103018,200903040-03);国家自然科学基金(31171823);现代农业产业技术体系(CARS-04-PS13)。

第一作者简介:段玉玺(1964-),男,教授,博导,主要从事植物病理学和植物线虫学教学和科研。E-mail:duanyx6407@163.com。

品种根部的次生代谢产物在抗线虫方面的差异,为合理利用抗病品种防治线虫和大豆植株中杀线活性成分的开发应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试线虫:大豆胞囊线虫 3 号生理小种(采自黑龙江省农业科学院大庆分院试验基地)。采用改良淘洗-过筛法分离胞囊,在体视解剖镜下挑出新鲜饱满成熟的胞囊。胞囊先用 0.5% NaClO 溶液表面消毒、无菌水冲洗后,放入组织破碎器中破碎胞囊,依次过 200 目至 500 目线虫标准筛,用无菌水收集 500 目筛子内的卵,于烧杯内孵化成线虫,收集 48 h 内孵化的 J2 线虫,备用。

供试大豆品种为五寨黑豆(抗病)和合丰 35(感病)。

1.2 方法

1.2.1 大豆植株中类黄酮化合物的提取 于大豆开花前取样,冲洗干净后,取地下部置于烘干箱内 80℃ 条件下充分干燥,用粉碎机粉碎,过筛。植株中类黄酮的提取参照赵卫星等^[8]方法略加改动:称取粉碎后的样品各 50 g,以物料比 1:10 的比例加入 80% 乙醇溶液,在 70℃ 条件下超声提取 24 h 后,抽滤收集液体,滤渣重复该过程,合并两次的浸提液,于旋转蒸发仪内蒸馏浓缩至膏状。用少量丙酮(低于 1%)溶解提取物,并加无菌水配成 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 类黄酮提取液。

1.2.2 对 SCN 胞囊孵化的抑制作用测定 挑取大小均匀一致的新鲜成熟胞囊,0.5% NaClO 溶液表面消毒、无菌水冲洗后,用组织破碎器破碎,把胞囊皮和卵洗入烧杯中,一并倒入 200 目和 500 目组筛,用无菌水冲洗并收集 500 目筛上卵,制成卵悬液。取 100 粒卵,用 1 mL 不同大豆品种根类黄酮提取物混匀,以加入等量清水(丙酮低于 1%)为对照,放入 1.5 mL 离心管中,28℃ 培养箱中孵化线虫。每个处理 4 次重复,分别于 24、48 和 72 h 调查 J₂ 的孵化数量,并计算相对抑制率。

$$\text{线虫孵化率}(\%) = \frac{\text{处理孵化线虫数}}{\text{处理线虫卵数}} \times 100$$

$$\text{线虫卵孵化抑制率}(\%) =$$

$$\frac{\text{对照结虫孵化率} - \text{处理线虫孵化率}}{\text{对照线虫孵化率}} \times 100$$

1.2.3 对胞囊线虫 J2 的室内毒杀活性测定 收集 48 h 孵化出的 J2,加水稀释后制成 50 条 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的线虫悬浮液。取 1 mL J2 线虫悬浮液离心去上清液后,加入 1 mL 不同大豆品种根类黄酮提取物,以加

入等量清水(丙酮低于 1%)为对照,分别于 24、48 和 72 h 观察 J2 在提取液中的存活情况,统计出线虫的存活数、死亡数,并计算死亡率。每个处理 4 次重复,线虫死亡计数标准参见文献^[9]。

$$\text{结虫死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100$$

$$\text{线虫校正死亡率}(\%) =$$

$$\frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100$$

1.2.4 SCN J2 生理活性抑制作用的测定 取线虫悬浮液 5 mL(浓度为 1×10^4 条 $\cdot\text{mL}^{-1}$),1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min,弃上清液,再加去离子水重复冲洗、离心 3 次。收集获得 J2 线虫,加入 2 mL 大豆类黄酮提取物,以不加提取物而加等量的丙酮作对照。处理 48 h 后,在 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去上清液,供试。

1.2.5 SCN 虫体蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝 G250 染色法,制作蛋白质标准曲线,测定线虫体内蛋白质含量,标准蛋白为牛血清白蛋白(电泳纯)。

取处理过的线虫约 5×10^4 条,加入 2 mL 缓冲液匀浆,放置 30 min,然后 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,上清液转入容量瓶,定容至 10 mL。吸取提取液 0.1 mL 放入具塞刻度试管中,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G250 蛋白试剂,充分混合,放置 2 min 后,在 595 nm 下比色,记录 OD 值,制作蛋白质标准曲线,得蛋白质标准曲线方程: $y = 0.187x + 0.048$, $R^2 = 0.992$ 。

线虫体内蛋白含量($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) = [标准曲线中得到的蛋白含量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) \times 样品稀释倍数]/线虫重量(mg)

1.2.6 SCN 虫体糖含量测定 SCN 虫体糖含量的测定及葡萄糖标准曲线的制作参照件均祥等^[10]的方法。

取处理过线虫约 5×10^4 条,10% 三氯乙酸溶液中冰浴匀浆并定容至 4 mL,在 4℃ 的冰箱中静置过夜后 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液 1 mL,加 95% 乙醇 5 mL,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min。弃上清液,沉淀物用 1 mL 蒸馏水溶解,为整体糖原制备物。取制备物 10 μL ,加双蒸水 1 mL。冰水浴中加入蒽酮试剂 0.3 mL,浓硫酸 3 mL,100℃ 沸水中加热 10 min,冷却,静置 20 min 后在 620 nm 波长下测定 OD 值。葡萄糖标准曲线方程为: $y = 0.0051x - 0.0375$, $R^2 = 0.995$ 。

将各处理线虫糖原反应后所测得的 OD 值代入标准曲线方程,求出其相当于葡萄糖的量(葡萄糖转化为糖原的转化系数为 0.9),以 $\mu\text{g}\cdot 1\ 000$ 条 $^{-1}$

为单位。

$$\text{整体线虫糖原含量}(\mu\text{g}\cdot 1\ 000\ \text{条}^{-1}) = \frac{\text{实测值} \times \text{稀释倍数} \times \text{转化系数}}{\text{处理线虫数}}$$

1.3 数据分析

采用 SAS 9.3 和 Excel 2003 进行数据统计,并用 Duncan's 新复极差进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 对胞囊线虫卵孵化抑制率的影响

从表 1 可以看出,不论抗病品种和感病品种,其根内类黄酮的提取物均可有效抑制大豆胞囊线虫卵的孵化。处理 48 h 时,两个品种的抑制率均最大,分别为 74.78% 和 65.75%,时间继续延长,抑制

表 1 大豆根内类黄酮提取物对胞囊线虫卵孵化的影响

Table 1 Effect of flavonoids extracted from soybean root on hatch of *Heterodera glycines* eggs(%)

处理 Treatment	24 h		48 h		72 h	
	孵化率 Hatchability	抑制率 Inhibiting rate	孵化率 Hatchability	抑制率 Inhibiting rate	孵化率 Hatchability	抑制率 Inhibiting rate
五寨黑豆 Wuzhaiheidou	18.49 bB	71.48	21.36 cC	74.78	39.68 cC	55.23
合丰 35 Hefeng 35	27.36 cC	58.72	29.05 bB	65.75	47.50 bB	45.86
对照 Control	65.67 aA	—	84.68 aA	—	87.74 aA	—

同列数据后不同小/大写字母分别表示差异显著($P < 0.05$)/极显著($P < 0.01$)。

Different lowercase or capital letters in the same column represented significant difference at $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively. The same below.

率下降,但品种间存在差异。抗病品种处理 24,48 和 72 h 对卵的孵化的抑制率明显高于感病品种,分别提高了 12.76%、9.03% 和 9.37%。

2.2 对胞囊线虫室内毒杀活性影响

由表 2 可知,两个品种的种类黄酮提取物对 J2 均有一定的毒杀作用。处理 24 h,五寨黑豆的抑制率

大于合丰 35,二者差异显著。随着处理时间的延长,J2 幼虫的死亡率均逐渐增加,但合丰 35 的毒杀效果明显大于五寨黑豆。处理 48 h 时,合丰 35 的校正死亡率比五寨黑豆显著增加 7.0%。处理 72 h 时,合丰 35 的校正死亡率比五寨黑豆显著增加 5.18%。

表 2 大豆不同品种类黄酮粗提物对大豆胞囊线虫 J2 的毒杀效果

Table 2 Nematicidal effect of flavonoids extracted from soybean root on J2(%)

处理 Treatment	24 h		48 h		72 h	
	死亡率 Mortality	校正死亡率 Revised mortality	死亡率 Mortality	校正死亡率 Revised mortality	死亡率 Mortality	校正死亡率 Revised Mortality
五寨黑豆 Wuzhaiheidou	46.23 aA	45.35	54.99 bB	50.96	65.87 bB	58.63
合丰 35 Hefeng 35	42.87 bB	41.93	60.77 aA	57.96	70.14 aAB	63.81
对照 Control	1.61 cC	—	6.68 cC	—	17.5 cC	—

2.3 对线虫体内含糖量的影响

不同品种类黄酮提取物处理大豆胞囊线虫 J2 幼虫 48 h 后,线虫体内的糖含量发生不同程度的改变(表 3),类黄酮提取物处理可使线虫体内糖含量减少。五寨黑豆根内类黄酮提取物处理后,线虫体内糖含量为 $57.64\ \mu\text{g}\cdot 1000\ \text{条}^{-1}$,与对照相比,达到极显著差异;合丰 35 处理后线虫体内糖含量为 $61.30\ \mu\text{g}\cdot 1000\ \text{条}^{-1}$,与对照相比,差异显著。两个处理对大豆胞囊线虫 J2 的糖含量的抑制率分别为 13.75% 和 8.20%,差异不显著。

2.4 对线虫体内蛋白质含量的影响

五寨黑豆和合丰 35 类黄酮提取物可以有效抑制 J2 幼虫体内的蛋白质含量。各个处理间蛋白质含量达极显著差异。五寨黑豆和合丰 35 根类黄酮提取物处理后 J2 幼虫的蛋白含量分别是 152.60 和 $292.87\ \mu\text{g}\cdot \text{mg}^{-1}$,对线虫体内蛋白质的抑制率分别为 57.07% 和 17.60%。五寨黑豆根类黄酮提取物的抑制率比合丰 35 的增加 39.37%,差异显著(表 3)。

表 3 不同品种类黄酮提取物对线虫体内糖和蛋白质含量的影响
Table 3 Effect of soybean varieties flavonoids extraction on glucose and protein content of *Heterodera glycines*

处理 Treatment	糖含量 Glucose contents /μg per 1000 nematode	J2 糖含量抑制率 Glucose inhibition rate/%	蛋白质含量 Protein content /μg·mg ⁻¹	J2 蛋白质抑制率 Protein inhibition rate/%
五寨黑豆 Wuzhaiheidou	57.64 bB	13.75	152.60 cC	57.07
合丰 35 Hefeng 35	61.30 bAB	8.20	292.87 bB	17.60
对照 Control	66.83 aA	—	355.43 aA	—

3 结论与讨论

许多研究表明,类黄酮化合物对于植物抗逆性、抗虫性的增强具有重要作用。类黄酮含量差异可以代表植物的抗旱性^[11]。不同的作物种类及其对逆境的耐性差异主要与体内类黄酮化合物的含量、类型和结构有关。大豆荚壳中类黄酮提取物的杀线活性已有报道^[8]。

本研究发现大豆不同品种根内类黄酮的提取物对大豆胞囊线虫 J2 和卵的孵化均有一定的抑制作用。抗、感品种对 J2 和卵的孵化存在一定差异,抗病品种对卵孵化的抑制作用大于其对 J2 幼虫的毒杀作用。生理毒性测定发现,类黄酮提取物影响糖和蛋白质的合成,使线虫不能正常生存而死亡。抗、感品种根内类黄酮提取物对糖的抑制作用差异不大,对蛋白质的抑制作用差异显著。由于大豆类黄酮是一类次生代谢物质,含有异黄酮和黄酮等诸多化合物,因此抗、感品种根提取物中有效成分的定量分析及其抑杀线虫的作用机理还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 刘维志,段玉玺. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000;1-3. (Liu W Z,Duan Y X. Plant pathogenic nematology [M]. Beijing:China Agriculture Press,2000;1-3.)

[2] 吴海燕. 大豆与大豆胞囊线虫相互关系研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2003;30-36. (Wu H Y. The interaction of resistant soybean and *Heterodera glycines*[D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2003;30-36.)

[3] 颜清上,王连铮,陈品三. 中国小黑豆抗源对大豆胞囊线虫 4 号生理小种抗病的生化反应[J]. 作物学报,1997,23(5):529-

537(Yan Q S,Wang L Z,Chen P S. Biochemical responses of resistance to race 4 of *Heterodera glycines* in China black soybean [J]. Acta Agronomica Sinica,1997,23(5):529-537.)

[4] 段玉玺,陈立杰. 大豆胞囊线虫病及其防治[M]. 北京:金盾出版社,2006;36-38. (Duan Y X,Chen L J. *Heterodera glycines* and its prevention[M]. Beijing:Shield Press,2006;36-38.)

[5] Kennedy,M J,Niblack T L,Krishnan I H B. Infection by *Heterodera glycines* elevates isoflavonoid production and influence soybean nodulation[J]. Journal of Hematology,1999,31:341-347.

[6] 延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544. (Yan X,Liu H Q,Zou Y Q,et al. Physiological activities and research advance in synthesis of flavonoids [J]. Chinese Journal Organic Chemistry,2008,28(9):1534-1544.)

[7] Marban M N,Dicklow M B. Evaluation of *M. incognita* and *Nacobus aberrans* on tomato by two plants[J]. Ravde de Nematologic,1989,12:409-412.

[8] 赵卫星,孙治强,高玉红,等. 大豆荚壳中类黄酮提取工艺及其抑杀线虫活性的研究[J]. 大豆科学,2007,26(3):373-376 (Zhao W X,Sun Z Q,Gao Y H et al. Studies on the extraction technological condition of total flavonoids in soybean hull and its nematocidal activity [J]. Soybean Science,2007,26(3):373-376.)

[9] 蔡秋锦. 植物性杀线剂的提取与毒杀效果[J]. 福建林学院学报,1998,18(4):291-293. (Cai Q J. Study on extraction and killing effect of plant nematocide [J]. Journal of Fujian College of Forestry,1998,18(4):291-293.)

[10] 作均祥,袁锋,苏丽. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化[J]. 昆虫学报,2004,47(2):178-183. (Wu J X,Yuan F,Su L. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge,*Sitodiplosismosellana*(Gehin) during mature and diapause stage [J]. Acta Entomologica Sinica,2004,47(2):178-183.)

[11] Michel H,Klaus K. The protective function of carotenoidal and flavoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis* and mutants [J]. Planta,2001,213:953-966.