

胞囊线虫侵染抗感大豆品种后根系谷胱甘肽代谢水平差异研究

孙家骥, 李爽, 朱晓峰, 王媛媛, 陈立杰, 刘晓宇, 陈井生, 段玉玺

(沈阳农业大学 植物保护学院/北方线虫研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 以大豆胞囊线虫 3 号生理小种抗性品种灰皮支黑豆(ZDD2315)和感病品种辽豆 15 为材料, 室内人工接种大豆胞囊线虫, 检测抗、感品种侵染后二龄幼虫数量变化及根内活性氧变化, 利用 Real-Time Quantitative PCR 分析了在大豆胞囊线虫 3 号生理小种互作下谷胱甘肽代谢途径相关基因在抗感大豆品种根内的相对表达量变化情况。结果表明: 接种后第 5 天, 抗感品种根内幼虫的数量大致相同; 第 15 天, 在灰皮支黑豆中, 根内线虫幼虫数量减少; 辽豆 15 根内 H_2O_2 含量始终略高于灰皮支黑豆; 大豆胞囊线虫侵染后, 谷氨酰胺半胱氨酸连接酶基因接种后 3 个时期的表达均上调; 而谷胱甘肽合成酶基因在感病品种和抗病品种中处理组呈现了不同的表达趋势, 尤其在接种 15 d, 在抗病品种灰皮支黑豆中表达下调, 而在感病对照中表达上调; H 型谷胱甘肽合成酶基因在抗性品种灰皮支黑豆中下调, 说明谷胱甘肽相关基因的减少和下调在抗病品种灰皮支黑豆对大豆胞囊线虫的抗性呈正相关, 导致大豆根系的氧化性增强, 从而不利于大豆胞囊线虫的定殖和发育。

关键词: 灰皮支黑豆; 谷胱甘肽; 大豆胞囊线虫; 荧光定量 PCR

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.03.0468

Glutathione Metabolism Different Expression in Resistant and Susceptible Soybean Roots after Infected by *Heterodera glycines* Ichinohe

SUN Jia-ji, LI Shuang, ZHU Xiao-feng, WANG Yuan-yuan, CHEN Li-jie, LIU Xiao-yu, CHEN Jing-sheng, DUAN Yu-xi

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University/Plant Protection Station of Liaoning Province, Shenyang 110866, China)

Abstract: The resistant variety Huipizhiheidou and susceptible cultivar Liaodou 15 were tested against soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*, SCN). The plants were inoculated with eggs of SCN 3 to test the number of the second stage juveniles and the content of reactive oxygen species. The expression of Glutathion synthesis pathway related genes were detected in the resistant Huipizhiheidou and the susceptible Liaodou 15 by Real-time Quantitative PCR. The results showed that at 5 dpi, no difference of J2 occurred between Huipizhiheidou and Liaodou 15, at 15 dpi, the number of juveniles invaded roots of Huipizhiheidou was less than Liaodou 15. Quantification of reactive species(ROS) was higher in Liaodou 15. The relative expression level of glutathione glutamate cysteine ligase was higher in Huipizhiheidou and Liaodou 15 after all inoculated times. In contrast, the expression of *GSHS* and *hGSHS* was significantly lower in Huipizhiheidou than in Liaodou 15 at 15 days. The reduction of glutathione related genes were positively related with resistance of Huipizhiheidou, lead to the oxidation of soybean root, which go against to the development of soybean cyst nematode.

Keywords: Huipizhiheidou; Glutathione; *Heterodera glycines* Ichinohe; Real-time Quantitative PCR

大豆胞囊线虫病(soybean cyst nematode, SCN)是由大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)侵染引起的大豆重要病害之一,可引起5%~10%的产量损失,严重甚至绝产^[1]。大豆胞囊线虫病的防治可采用轮作、杀线剂等方法,培育抗病品种是最经济有效的方法。灰皮支黑豆国家品种资源编号ZDD2315,原产地山西省兴县,研究表明是最好的抗

源材料,对大豆胞囊线虫1、2、3、4、5、7、14号生理小种均表现抗病^[2]。在植物与病原物互作中,会激发寄主产生一系列生理生化反应,如活性氧(reactive oxygen species, ROS)迸发、防御酶系活性变化、植保素的合成等。ROS是植物细胞代谢的产物,真菌、细菌、病毒病原物等都会引起ROS的过量产生,同时ROS可以作为植物防御机制的重要信号调节分

收稿日期: 2016-02-01

基金项目: 国家自然科学基金(31171569); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-PS13); 农业部公益性行业科研专项(201503114); 教育部博士点基金(20112103110006)。

第一作者简介: 孙家骥(1990-),男,硕士,主要从事大豆胞囊线虫研究。E-mail: sunjiaji007@foxmail.com。

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

子,诱导防御基因的表达,增强植物抗逆性和抗病性^[3-6]。谷胱甘肽(L- γ -谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸, Glutathione)是一种同时具有 γ -谷氨酰基和巯基的生物活性三肽化合物,对清除 ROS 和外源性有害物质及其代谢产物有重要作用^[7]。作为生物体内的非蛋白巯基化合物,谷胱甘肽调节胁迫下应激防御基因的表达和参与植物抵抗真菌和细菌以及食草昆虫的危害^[8-10]。谷胱甘肽分为还原型(GSH)和氧化型(GSSG)两种形态,还原型谷胱甘肽在机体中大量存在并起主要的作用。谷胱甘肽合成由两步完成,第一步,由 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(Glutamate-cysteine ligase, Gcl)催化谷氨酸和半胱氨酸生成二肽 γ -谷氨酰半胱氨酸;第二步, γ -谷氨酰半胱氨酸在 GSIS 和 hGSIS 催化下分别与甘氨酸和丙氨酸生成 GSH 和 hGSH。据报道,在模式豆科植物苜蓿中, H 型谷胱甘肽的缺失改变了互作固氮作用同时减少了根瘤的生成^[11]。缺失 H 型谷胱甘肽的植物对于苜蓿中华根瘤菌的侵染表现出基因下调,在根结线虫侵染下表现出 hGSIS 基因下调,并且通过降低雌虫比例来减少线虫的繁殖,在植物互作中 h 型谷胱甘肽起到了调节植物防御反应的作用^[12-13]。

关于大豆胞囊线虫抗病品种中谷胱甘肽代谢与抗病性关系目前尚不清楚,本文以抗性品种灰皮支黑豆和感病品种辽豆 15 为试验材料,检测抗、感品种侵染后二龄幼虫数量变化、根内活性氧变化及谷胱甘肽相关基因表达量差异,为揭示抗病品种灰皮支黑豆抗大豆胞囊线虫抗性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

抗病品种灰皮支黑豆(ZDD2315)和感病品种辽豆 15,均为沈阳农业大学北方线虫研究所保存资源。

1.2 方法

1.2.1 大豆胞囊线虫孢囊的获得 大豆胞囊线虫 3 号生理小种采自沈阳农业大学试验地,采用改良淘洗-过筛法分离孢囊,利用体式解剖镜挑出饱满成熟孢囊。消毒后 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 大豆胞囊线虫的收集 将孢囊放在硫酸锌溶液中 25℃ 下孵化,5 d 后收集二龄幼虫,期间每日换硫酸锌溶液。将收集到二龄幼虫混入 0.2% 的灭茵琼脂制备成 2 000 条·mL⁻¹ 的虫悬液^[14]。

1.2.3 大豆胞囊线虫的接种 将供试大豆种子用

湿润的滤纸包裹,置于培养皿中,25℃ 条件下催芽,期间及时换水。催芽后将种子移栽到装有高温灭菌的砂土混合物(体积比 1:2)的塑料盆中(16 cm × 21 cm)。在大豆苗期接种大豆胞囊线虫悬液,每株约 2 000 条,以不接种线虫作对照,置于温室内培养,定期定量浇水。

1.2.4 大豆根系的获得 分别于接种后 5、10、15 d 取样,每次随机取 3 株,蒸馏水冲洗后,用滤纸吸干水分,随即用铝箔纸包好置于液氮中,-80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2.5 大豆根组织内线虫的染色 将接种后 5、10、15 d 的幼苗从砂土中取出,用蒸馏水冲洗根系,然后参照刘维志^[14]的方法进行次氯酸钠-酸性品红染色。

1.2.6 大豆根部活性氧含量测定 活性氧测定使用 GENMED 植物过氧化氢含量比色法定量检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司)。

1.2.7 引物设计 根据 GeneBank 上查询的基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物,谷氨酰胺半胱氨酸连接酶(Gcl)、谷胱甘肽合成酶(GSIS)和 h 型谷胱甘肽合成酶(hGSIS),引物均由生工生物工程股份有限公司合成,序列为:

Gcl-F: 5'-TGAAGACACCATTCCGAGAC-3'

Gcl-R: 5'-ACACCTGTTCTAACCACCTC-3'

hGSIS-F: 5'-ACCTTTGACCACCAACTCTG-3'

hGSIS-R: 5'-CACCCTTGCTTCCAATGACT-3'

GSIS-F: 5'-TCTCCACGGTCTCCTTGTCTG-3'

GSIS-R: 5'-CTCATCCGCTTTCTTAGTTC-3'

1.2.8 根系总 RNA 的提取和反转录 大豆根部样品在研钵中加入液氮研磨。总 RNA 提取使用天根去多糖多酚的 RNA 提取试剂盒(Tiangen)。cDNA 第一链合成使用天根 cDNA 合成试剂盒。

1.2.9 荧光定量 PCR 扩增反应体系(20 μ L): 10 μ L TAKARA SYBR MIX, 8 μ L ddH₂O,正向反向引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L。将 PCR 反应所需的组分混合后分装于 Real-time 专用 96 孔板中,在 Bio-Rad system 上进行扩增,每个反应重复 3 次。扩增程序: 95℃ 10 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环。

1.3 数据分析

相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行分析,Excel 2007 作图。

2 结果与分析

2.1 胞囊线虫在灰皮支黑豆和辽豆 15 根系中的发育情况

如图 1 所示,在大豆胞囊线虫二龄幼虫侵染大豆根部的第 5 天,在抗感品种之间,根内部线虫的数以及发育的状态大致相同,辽豆 15 幼虫数略高。在 SCN 侵染大豆根部 10 d 后,在抗病材料的根部,线虫发育滞后于感病材料,且大多停留在二龄幼虫的状态,三龄和四龄幼虫较少;而在感病材料中,二龄幼虫数量减少,大多数幼虫发育成三龄幼虫且体态渐渐增大,呈水滴型,三龄、四龄幼虫比例较高。SCN 侵染大豆根部 15 d 后,在抗病材料中,根内线虫幼虫数量减少,根内线虫发育较感病品种更为迟缓。而在感病品种根系内部,二龄幼虫数量减少,大部分发育良好形成三龄、四龄幼虫,说明抗病品种灰皮支黑豆对大豆胞囊线虫 3 号小种的发育具有阻碍作用。

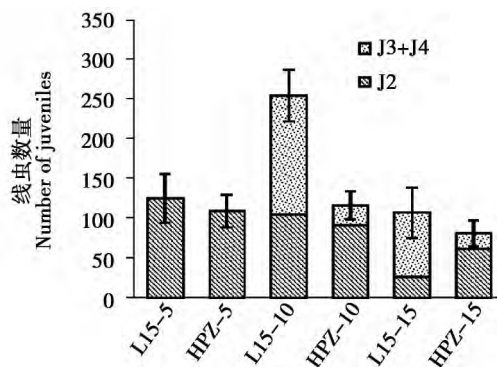
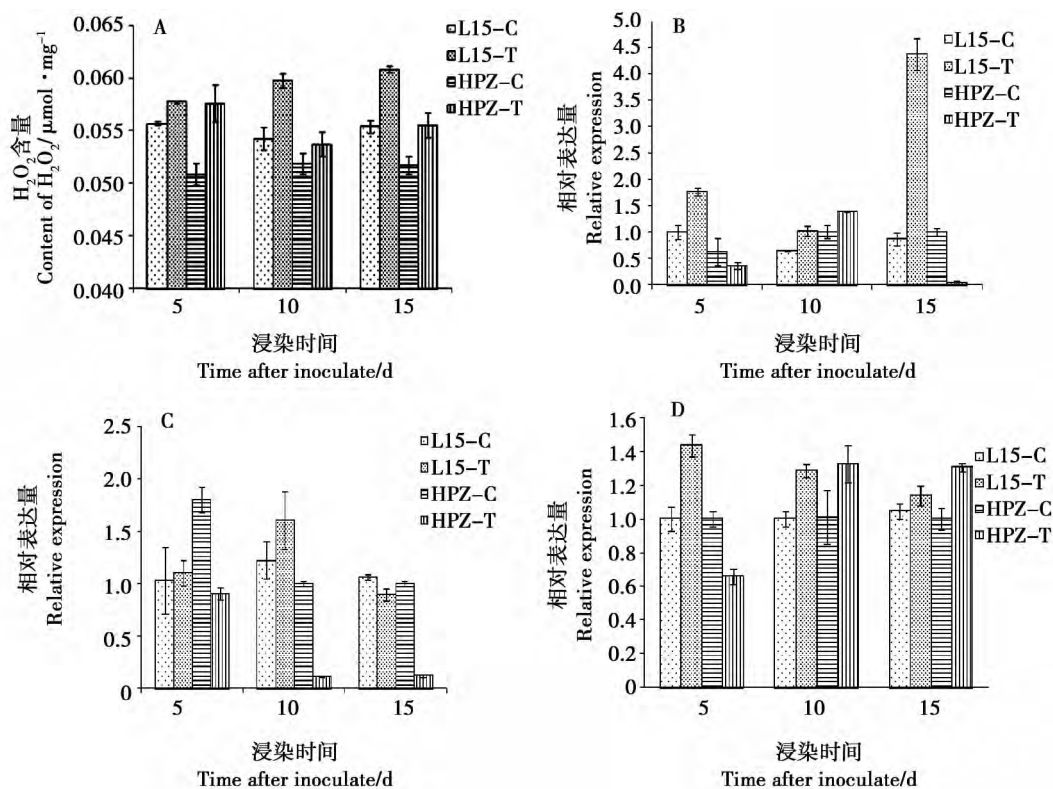


图 1 大豆抗、感品种根内大豆胞囊线虫 J2 幼虫数量

Fig. 1 Number of J2 and J3 + J4 into roots of Huipizhiheidou (resistant) and Liaodou 15 (susceptible)

2.2 大豆根部的活性氧含量

辽豆 15 和灰皮支黑豆,接种后根内 H_2O_2 含量始终高于对照组,相同接种天数时,辽豆 15 根内 H_2O_2 含量始终略高于灰皮支黑豆,这可能因为感病品种受线虫侵染较多,防御反应强于抗性品种(图 2)。



L15-C: 辽豆对照; L15-T: 辽豆 15 接种; HPZ-C: 灰皮支黑豆对照; HPZ-T: 灰皮支黑豆接种。

L15-C: Liaodou 15 control; L15-T: Liaodou 15 inoculated; HPZ-C: Huipizhiheidou control; HPZ-T: Huipizhiheidou inoculated.

图 2 大豆胞囊线虫侵染后大豆根系 H_2O_2 含量 (A) 及 $GSHS$ (B)、 $hGSHS$ (C) 和 Gcl 基因的相对表达量 (D)

Fig. 2 Quantification of H_2O_2 in root diameters (A) after inoculated by *Heterodera glycines* Ichinohe and relative expression of $GSHS$ (B), $hGSHS$ (C) and Gcl (D) genes

2.3 谷胱甘肽合成途径相关基因表达

2.3.1 *GSHS* 基因 如图 2B 所示,在线虫侵染第 5 和 15 天,在灰皮支黑豆中表达下调,第 10 天表达上调;在辽豆 15 中,接种后第 5、10 和 15 天均表达上调;第 15 天时,灰皮支黑豆对照组表达量是处理组的 25.05 倍,相比在辽豆 15 中,*GSHS* 基因上调,处理组是对照组的 5.00 倍;接种后第 5 和 15 天,辽豆 15 中的 *GSHS* 基因相对表达量显著高于灰皮支黑豆。

2.3.2 *hGSHS* 基因 灰皮支黑豆在线虫侵染第 5、10 和 15 天 *hGSHS* 基因表达下调,对照组分别为处理组的 1.98、8.84 和 8.11 倍;辽豆 15 在侵染第 5 和 10 天,基因表达上调,第 15 天略有下降;不同接种天数时,辽豆 15 的 *hGSHS* 基因相对表达量始终高于灰皮支黑豆(图 2C)。

2.3.3 *Gcl* 基因 灰皮支黑豆在线虫侵染第 5 天,*Gcl* 基因表达下调,第 10 和 15 天表达均上调;而辽豆 15 在侵染第 5、10 和 15 天,接种线虫处理组均高于对照组;接种后第 5 天,辽豆 15 *Gcl* 基因相对表达量高于灰皮支黑豆,第 10 和 15 天,灰皮支黑豆高于辽豆 15(图 2D)。

3 结论与讨论

苜蓿和南方根结线虫(Root knot nematode, RKN)互作中,谷胱甘肽的合成途径相关基因的表达受到了线虫的影响,Cresp 等^[13]报道 H 型谷胱甘肽对线虫的发育起到了至关重要的作用;在大豆和大豆胞囊线虫互作中,H 型谷胱甘肽合成酶(*hGSHS*)基因相对表达量在感病品种接种 SCN 第 5 和 10 天表达上调,在抗病品种中 3 个时间点均表达下调;感病品种处理组在侵染后 3 个时间点表达量均高于抗病品种。说明在植物和线虫互作过程中,H 型谷胱甘肽合成酶对大豆胞囊线虫的生长和发育可能起到一定程度的影响,且 *hGSHS* 的表达量与植物寄生线虫的发育和繁殖呈正相关。谷氨酰半胱氨酸连接酶(*Gcl*) 在抗、感品种接种第 10、15 天,比未接种对照组相比表达均上调,而谷氨酰半胱氨酸连接酶(*GSHS*) 在苜蓿与根结线虫的互作中,表达下调,推测基因 *Gcl* 在不同寄主和线虫的互作中发挥着不同的作用。在大豆和 SCN 的互作中,谷胱甘肽合成酶可能参与植物的生长和发育,调控线虫胁迫下植物的营养代谢以控制 SCN 在大豆根内的发育和繁殖。谷胱甘肽合成酶的下调与抗病品种灰皮支黑豆对 SCN 的抗性呈正相关,导致大豆根系的氧化性增强,从而不利于 SCN 的定殖和发育,关于其在抗 SCN 发育和繁殖中的作用还有待于进一步

研究。

参考文献

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. (Liu W Z. Plant pathogenic nematology[M]. Beijing: Agriculture Press, 2000.)
- [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. (Wu H Y. The interaction of resistant soybeans and *Heterodera glycines* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2003.)
- [3] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48: 251-275.
- [4] Wojtaszek P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection[J]. The Biochemical Journal, 1997, 322: 681-692.
- [5] Doke N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* [J]. Physiological Plant Pathology, 1983, 23: 345-357.
- [6] Orozco-Cardenas M, Ryan C A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and system in *via* the octadecanoid pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1999, 96: 6553-6557.
- [7] Rouhier N, Lemaire S D, Jacquot J P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 143-166.
- [8] Ball L, Accotto G P, Bechtold U, et al. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16: 2448-2462.
- [9] Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, et al. Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2007, 49: 159-172.
- [10] Schlaeppli K, Bodenhausen N, Buchala A, et al. The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera litoralis* [J]. Plant Journal, 2008, 55: 774-786.
- [11] Frendo P, Harrison J, Norman C, et al. Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula* [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2005, 18: 254-259.
- [12] Pucciariello C, Innocenti G, van de Velde W, et al. (Homo) glutathione depletion modulates host gene expression during the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti* [J]. Plant Physiology, 2009, 151: 1186-1196.
- [13] Baldacci-Cresp F, Chang C, Maucourt M, et al. (Homo) glutathione deficiency impairs root-knot nematode development in *Medicago truncatula* [J]. Plos Pathogens (Online), 2012, 8 (1): e1002471.
- [14] 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. Research techniques of plant nematology [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1995.)