

大豆异黄酮合成关键酶基因对蚜虫取食的防御响应分析

李娜,于希森,李琪,李涵哲,李洋,徐婷婷,孟凡立

(东北农业大学大豆生物学省部教育部重点实验室/东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以蚜虫差异抗性的大豆品种 PI567598B(高抗)、绥农 30(抗)、东农 51(中抗)和 Williams 82(感)为试验材料,分别于接种大豆蚜虫 0,7,14 和 21 d 时采集大豆叶片,利用 qPCR 对异黄酮合成关键酶基因苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)、黄烷酮-3-3 羟化酶(*F3H*)、大豆异黄酮合成基因 1 (*ISF1*) 和 大豆异黄酮合成基因 2 (*ISF2*) 的表达量进行分析。结果表明:蚜虫取食前高抗品种 PI567598B 中 *PAL*、*F3H*、*ISF1* 和 *ISF2* 基因的相对表达量均高于感虫品种 Williams 82;蚜虫取食后,抗蚜品种 PI567598B 和绥农 30 中 *PAL* 基因在蚜虫取食 14 d 时显著上调,在 21 d 时达到最大,*F3H* 基因 7 d 时表达量最高,然后降低;*ISF2* 表达量于蚜虫取食 7 d 后显著上调,在 21 d 时达到最大;中抗品种东农 51 中 *PAL*、*ISF2* 和 *F3H* 基因表达量在 7 d 时增加,但不显著;而感蚜品种 Williams 82 蚜虫取食后 *PAL* 和 *ISF2* 表达量增加但不显著,且相对表达量显著低于抗蚜品种,*F3H* 基因表达量不增反降;抗感大豆品种蚜虫取食后 *ISF1* 基因表达均诱导不显著。研究表明,感蚜大豆品种蚜虫取食前后异黄酮合成关键酶基因表达量都比较低,而抗虫品种异黄酮合成关键酶基因表达量高,且防御响应持续时间长,符合其抗性差异。

关键词:大豆;异黄酮;关键基因;大豆蚜虫;防御响应

中图分类号:S565.1 文献标识码:A DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0800

The Analysis of Key Gene of Soybean Isoflavone Synthesis Response to Aphid Feeding Defense

LI Na, YU Xi-sen, LI Qi, LI Han-zhe, LI Yang, XU Ting-ting, MENG Fan-li

(1. Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to elucidate isoflavone mechanisms of the response to aphid in the soybean plants, different-resistant soybean varieties PI567598B (high), Suinong 30 (medium), Dongnong 51 (low) and Williams 82 (flu), were inoculated by soybean aphid for 0, 7, 14 and 21 days. Using qPCR, the expression patterns of key enzyme genes were analyzed in response to aphid feeding defense, including Phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), Flavanone hydroxylase -3-3 (*F3H*), Isoflavone synthase gene 1 (*ISF1*) and Isoflavone synthase gene 2 (*ISF2*). The results showed leaves from PI567598B had higher *PAL*, *F3H*, *ISF1* and *ISF2* expression than Williams 82 without aphid attack. The *PAL* gene in PI567598B and Suinong 30 was increased significantly after inoculated 14 d and reached highest level at 21 d. The *F3H* gene was increased rapidly at 7 d and then showed a decreasing trend; the *ISF2* gene was increased rapidly and the highest in 24 h. The *PAL*, *ISF2* and *F3H* genes in Dongnong 51 were not induced significantly after inoculated 7 d. The *PAL* and *ISF2* genes in Williams 82 were not induced significantly and lower than other three lines even after being damaged by aphid, while gene expression of *F3H* decreased after inoculation. The expression of *ISF1* gene was not induced in four lines after inoculation. These result showed that the expression level of isoflavone key enzyme gene were higher and longer in resistant varieties than that in susceptible soybean varieties, which was consistent with its resistance differences.

Keywords: Soybean; Isoflavones; Key Genes; Soybean Aphid; Defense Response

大豆蚜虫(*Aphis glycines* Matsunura)是大豆苗期的主要害虫之一^[1],大量蚜虫取食使大豆植株卷曲矮化,使植株的光合机能受到影响^[2],且大豆蚜虫还是大豆花叶病毒(SMV)等多种植物病毒的传播者^[3]。大豆异黄酮是一类普遍存在豆科植物中的酚类化合物的总称,是大豆重要的次生代谢产物之

一^[4]。大豆异黄酮不仅能增加豆科植物抵御真菌性病害和病毒的能力,而且其含量还与豆科植株对害虫的抗性相关^[5,6]。2010 年,在豇豆中发现种子异黄酮含量和植株抗虫性有关,异黄酮含量越高对害虫抗性越高^[7]。2011 年的研究表明大豆蚜虫取食大豆真叶后诱导产生的异黄酮含量与大豆抗蚜

收稿日期:2016-03-29
基金项目:国家自然科学基金青年基金(31201229);转基因大豆新品种培育重大专项(2011ZX08004-004);中国博士后启动基金(2012M510914);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z11223);东北农业大学博士启动基金(2012RCB07)。
第一作者简介:李娜(1990-),女,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:a01100187@163.com。
通讯作者:孟凡立(1978-),女,博士,副教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:fanli78@sina.com。

性存在一定的关系^[8]。

大豆异黄酮由苯丙氨酸次生代谢途径的一个分支合成,从最初的苯丙氨酸至最终合成异黄酮的过程涉及许多酶,其代谢关键基分别为苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*)、黄烷酮-3-3羟化酶基因(*F3H*)、异黄酮合成酶基因1(*IFS1*)和异黄酮合成酶基因2(*IFS2*)^[9]。虽然现有的研究发现大豆异黄酮能被多种害虫取食所诱导,但在大豆抗蚜防御响应中的角色并不清楚,大豆异黄酮合成关键酶基因表达是否与大豆品种的不同抗蚜性有关也有待进一步研究。本研究在前期研究基础上,以4个抗感不同的大豆品种为材料,分析不同抗蚜大豆品种叶片被蚜虫取食后大豆异黄酮合成关键酶基因表达模式,为进一步阐明大豆异黄酮参与大豆抗蚜虫防御响应的机制奠定基础,也为大豆抗蚜育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以抗虫材料绥农30(黑龙江省农业科学院绥化分院)、中抗材料东农51(东北农业大学大豆研究所)、高抗性材料PI567598B和感蚜材料Williams82(东北农业大学大豆研究所保存)为试验材料。大豆蚜虫于2008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℃,光照18 h,相对湿度70%)利用东农47幼苗进行繁殖^[10-11]。异黄酮标准样品购于Sigma公司(美国)。色谱甲醇购于J. T. Baker公司(美国)。分析乙醇购于北京化工厂。高效液相色谱仪(HPLC)P680型为美国戴安(DIONEX)公司生产。固相为C18反相柱(HICHROM316A-LOK(UK), 150 mm×4.9 mm)。

1.2 试验设计

于2015年4月在东北农业大学大豆研究所人工气候箱内种植供试材料,每个品种10株,3次重复,随机排列。当大豆V1期,用毛笔在大豆真叶各背面接10头无翅蚜,整个试验期间在底部浇水以免把叶上的蚜虫浇掉。接蚜之前进行第一次取样作为对照(0 d),接蚜后每隔7 d取样1次,每次取顶部叶缘完全展开的第一片叶,液氮研磨成粉末于-80℃保存。

1.3 荧光定量PCR

利用Trizol reagent提取大豆叶片的总RNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,用Nanodrop2000测定浓度。质量检测合格的RNA采用Fermentas公司M-MLV反转录酶合成cDNA。使用Primer 5软件设计荧光定量PCR特异性引物,

以cDNA作为模板,利用荧光定量PCR对不同大豆材料的苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)、黄烷酮-3-3羟化酶基因(*F3H*)、大豆异黄酮合成基因1(*ISF1*)和大豆异黄酮合成基因2(*ISF2*)进行检测。利用OptionMonitor软件,并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析各基因相对表达量,每个样本3次重复。相对表达量分析:以 β -actin为内参基因,根据扩增曲线得到的Ct值(荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数),利用推导公式相对表达量= $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算出目标基因的相对表达量,从而制作相对表达量图表,式中 $\Delta Ct = Ct_{\text{待测基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 。荧光定量PCR按照TOYOBO公司SYBR® Green Realtime PCR Master Mix-Plus-程序进行。荧光定量PCR反应中所使用的基因均有上海生物工程技术服务公司合成,引物序列如下:

actin4-s: 5' GTGTCAGCCATACTGTCCCCATTT 3'
actin4-a: 5' GTTTCAGCTCTTGCTCGTAATCA 3'
PAL-s: 5' ATTATGGATTCAAGGGAGCT 3'
PAL-a: 5' AATGAGGAAAGTGGAGGACA 3'
F3H-s: 5' GGAGACGGAGGAATACAGCG 3'
F3H-a: 5' GCCAAGAGTGAGGTCAGGTT 3'
IFS1-s: 5' GGTTCCAAACCTCTGCCATA 3'
IFS1-a: 5' CTGTTGGGTCCCTCAAAGGCC 3'
IFS2-s: 5' GGGCACTGGCAGAACTCA 3'
IFS2-a: 5' CATCACGATTGCTCTAATGTAAG 3'

1.4 数据分析

用Excel 2010进行原始数据的处理和制图,用DPS 7.05进行其它相关的分析。

2 结果与分析

2.1 蚜虫侵害前后苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量分析

如图1所示,PI567598B、绥农30和东农51在受蚜虫侵害前*PAL*基因相对表达量高于Williams82,蚜虫取食7 d后PI567598B和绥农30的*PAL*基因相对表达量低于侵害前,而东农51和Williams82*PAL*基因相对表达量高于侵害前。14 d时PI567598B和绥农30的*PAL*基因表达表现出明显的上升趋势,在21 d时达到最大;而东农51和Williams82*PAL*基因表现为先减少后增加,但在21 d时*PAL*基因表达量明显低于PI567598B和绥农30。

2.2 蚜虫侵害前后黄烷酮-3-3羟化酶基因相对表达量分析

从图2可见,PI567598B、绥农30和东农51*F3H*表达量于蚜虫取食7 d时表达量最高,然后降低;而感虫品种Williams82蚜虫取食前*F3H*基因相对表达量较高。

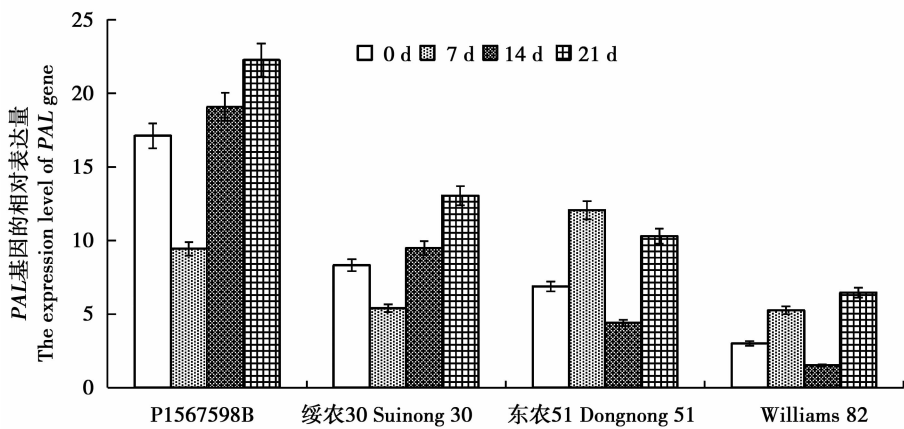


图 1 苯丙氨酸解氨酶基因表达量分析
Fig. 1 Gene expression analysis of PAL

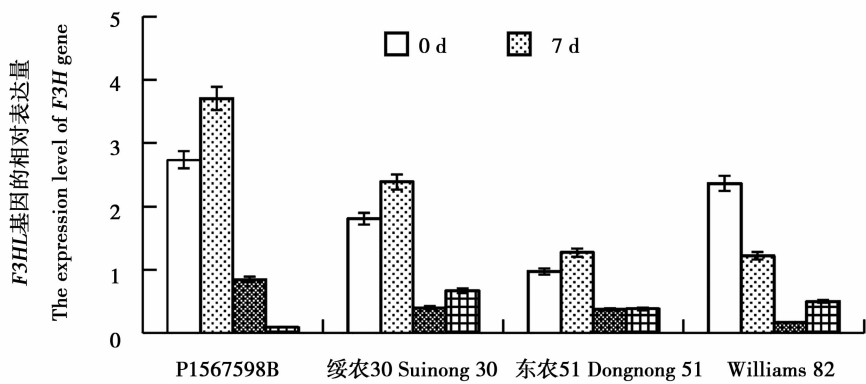


图 2 黄烷酮-3-羟化酶基因的相对表达量分析
Fig. 2 The relative expression analysis of F3H

2.3 蚜虫侵害前后大豆异黄酮合成基因相对表达量分析

对蚜虫取食前后大豆异黄酮合成基因 1 (*IFS1*) 和大豆异黄酮合成基因 2 (*IFS2*) 相对表达量进行分析,结果表明抗感大豆品种蚜虫取食前后 *IFS1* 相对表达量无明显差异,*IFS1* 基因不被蚜虫取食所诱

导(图 3)。抗感大豆品种蚜虫取食前叶片内 *IFS2* 相对表达量都很低,蚜虫危害后 *IFS2* 相对表达量显著增加,而且 P1567598B 和绥农 30 增加显著高于东农 51 和 Williams 82,表明蚜虫取食处理诱导 *IFS2* 相对表达量增加,而且增加幅度与大豆品种抗性有一定的相关性。

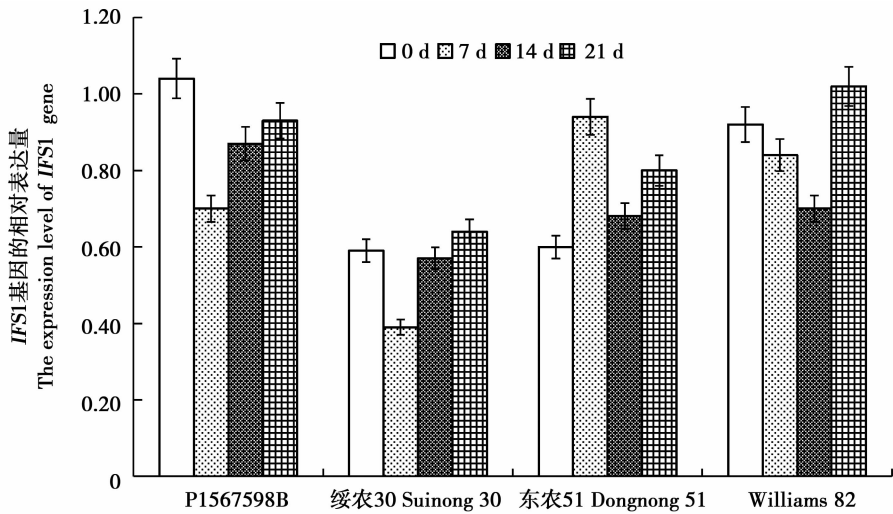


图 3 异黄酮合成酶基因 1 相对表达量分析
Fig. 3 The relative expression analysis of IFS1

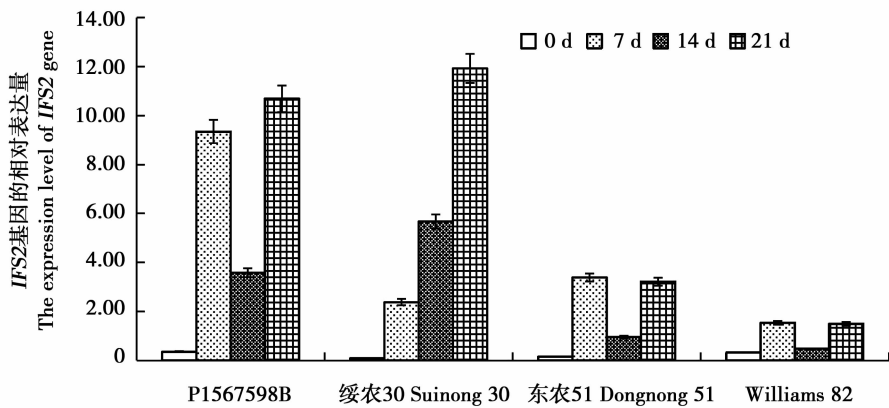


图4 异黄酮合成酶基因2 相对表达量分析
Fig. 4 The relative expression analysis of *IFS2*

3 结论与讨论

苯丙氨酸次生代谢途径较为庞大,异黄酮合成途径只是其中一个分支途径。苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)是进入该途径的第一个酶,也是关键酶与限速酶^[12-14]。2009 年,姜伊娜等^[15]研究表明抗虫大豆品种具有高水平 *PAL* 表达酶活性,与感蚜品系存在显著差异;蚜虫侵害诱导后 *PAL* 酶活性均有上升,且抗蚜品系表现稳定,表明 *PAL* 酶活性与大豆的抗蚜性存在明显的相关性。本研究也发现抗性品种 P1567598B 和绥农 30 蚜虫侵害前 *PAL* 基因表达量高于感虫品种 Williams 82。抗性品种接蚜 7 d 时蚜虫定居少且原有 *PAL* 基因表达量较高,足以调节次生代谢产物产生,未诱导 *PAL* 基因表达量增加;随着原有 *PAL* 酶被消耗和蚜虫侵害程度增加,抗虫品种 *PAL* 基因表达量增加,并在 21 d 达到最高。而感虫品种 Williams 82 原有 *PAL* 基因表达量较低,蚜虫取食后 *PAL* 基因表达量先增加后降低然后又增加,但 *PAL* 基因表达量一直显著低于抗虫品种;表明抗性品种蚜虫取食后 *PAL* 基因表达量高且持续时间长,可活化苯丙氨酸代谢途径以提高大豆植株对大豆蚜虫防御能力。

黄烷酮-3-3-羟化酶基因(*F3H*)在苯丙氨酸次生代谢途径中和异黄酮合成酶(*IFS*)竞争共同底物用于合成类黄酮^[16]。黄酮类化合物也是植物重要的次生代谢产物之一,是大豆抵御真菌病害的重要防御物质^[9]。本文研究表明抗性品种在接蚜 7 d 时黄烷酮-3-羟化酶基因(*F3H*)的相对表达量显著增高,而感虫品种 Williams 82 受到蚜虫取食危害后 *F3H* 基因表达量不增加反而下降,因此推测 *F3H* 基因相对表达量可能与某些黄酮类化合物合成有关,该黄酮类化合物可能影响大豆蚜虫对寄主的选择,与大豆品种早期抗蚜性相关。

大豆异黄酮合成酶(*IFS*)是进入异黄酮合成途径的第一个中间合成酶,与黄烷酮-3-羟化酶(*F3H*)竞争共同底物甘草黄素和柚苷配基用于合成异黄酮^[16-18]。*IFS1* 和 *IFS2* 是大豆中的两个异黄酮合成酶同源基因,蛋白质序列中仅存在 14 个氨基酸差异,但二者表达量差异很大^[4]。Dhaubhade 等^[4]研究表明大豆疫霉根腐病(*P. sojae*)能诱导 *IFS2* 基因表达量增加,但 *IFS1* 基因表达量微变化。本研究中抗感大豆品种蚜虫取食前后 *IFS1* 基因相对表达水平没有发生显著变化,而 *IFS2* 基因在蚜虫取食危害后期相对表达量显著增加,且抗虫品种高于感虫品种。

植物抗虫防御响应涉及一个庞大而复杂的系统,植物在与害虫长期相互作用和共同进化过程中,通过各种代谢途径在体内形成各种形式的次生代谢产物或防御蛋白以抵抗害虫侵害。本研究通过分析抗感大豆异黄酮合成关键酶基因表达量与大豆抗蚜防御应答的关系,表明抗虫品种在蚜虫取食早期诱导产生合成类黄酮,蚜虫后期诱导产生异黄酮来防御大豆蚜虫的危害,异黄酮合成关键酶基因表达量高,且防御响应持续时间长,为进一步探究大豆异黄酮在大豆重要害虫防御响应中的关系提供依据,也为抗虫大豆在抗性育种中的应用提供了理论依据。

参考文献

[1] Hill C B, Li Y, Hartman G L. A single dominant gene for resistance to the soybean aphid in the soybean cultivar dowling[J]. Crop Science, 2006, 46: 1601-1605.
[2] 孟凡立,刘立承,李文滨,等. 蚜虫取食和机械损伤对大豆真叶中异黄酮的诱导作用[J]. 大豆科学,2010,29(4):264-267. (Meng F L, Liu L C, Li W B, et al. Comparing on the inducing isoflavonoids content in leaf of soybean aroused by soybean aphid and mechanical damage[J]. Soybean Science,2010,29(4):264-267.)

[3] Mensah C, Christina D F. Resistance to soybean aphid in early maturing soybean germplasm [J]. Crop Science, 2005, 45: 2228-2233.

[4] Dhaubhadel S, McCarvey B D, Williams R, et al. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 53: 733-743.

[5] Subramanian S, Hu X, Lu G, et al. The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54 (5): 623-39.

[6] 孟凡立,王志坤,臧振原,等. 异黄酮含量与大豆对大豆蚜虫抗性之间的关系 [J]. 作物杂志, 2011 (3): 11-15. (Meng F L, Wang Z K, Zang Z Y, et al. Relationship between isoflavones content and soybean resistance to soybean aphid [J]. Crops, 2011 (3): 11-15.)

[7] Joachim H J R M, Alphonsus K B, Samson B M C, et al. Seed isoflavonoids and anthocyanins as markers of enhanced plant defence inoculated cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) [J]. Field Crops Research, 2010, 118 (1): 21-27.

[8] 孟凡立,王志坤,孙晶,等. 蚜虫取食大豆诱导大豆异黄酮的变化规律 [J]. 作物杂志, 2011 (1): 59-63. (Meng F L, Wang Z K, Sun J, et al. Change of isoflavanones content in leaf of soybean induced by soybean aphid [J]. Crops, 2011 (1): 59-63.)

[9] 张大勇. 大豆异黄酮含量的影响因素分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2009. (Zhang D Y. The factors analysis of soybean isoflavone content [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2009.)

[10] Huang W, Jia Z K, Han Q F. Effects of herbivore stress by *Aphis medicaginis* Koch on the Malondialdehyde contents and the activities of protective enzymes in different alfalfa varieties [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (6): 2177-2183.

[11] 孟凡立,李文滨,段玉玺,等. 大豆蚜虫抗性鉴定技术及抗性资源筛选 [J]. 大豆科学, 2010, 29 (3): 457-460. (Meng F L, Li W B, Duan Y X, et al. Identification techniques and screening of soybean aphid resistant germplasm [J]. Soybean Science, 2010, 29 (3): 457-460.)

[12] Yu O, Shi J, Hession A O, et al. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed [J]. Phytochemistry, 2003, 63 (7): 753-763.

[13] 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 isoflavanones and relative expression quantity of *PAL* gene [J]. Soybean Science, 2009, 28 (4): 670-673.)

[14] 谢灵玲,赵武玲,沈黎明. 光照对大豆叶片苯丙氨酸裂解酶 (*PAL*) 基因表达及异黄酮合成的调节 [J]. 植物学通报, 2000, 17 (5): 443-449. (Xie L L, Zhao W L, Shen L M. Light regulation of the expression of *PAL* gene in soybean leaves and isoflavone synthesis [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000, 17 (5): 443-444.)

[15] 姜伊娜,王彪,武天龙. 蚜虫侵害对不同基因型大豆酶活性及次生代谢物含量的影响 [J]. 大豆科学, 2009, 28 (1): 103-107. (Jiang Y N, Wang B, Wu T L. Response of enzyme activity and secondary metabolites of different soybean genotypes to *Aphis glycines* Matsmura Invasion [J]. Soybean Science, 2009, 28 (1): 103-107.)

[16] 王艳,武林,孙梦阳,等. 不同生育时期大豆异黄酮合成相关酶基因表达的分析 [J]. 大豆科学, 2012, 31 (6): 887-893. (Wang Y, Wu L, Sun M Y, et al. Analysis of gene expression underlying soybean isoflavone synthesis relative enzymes at different growth stages [J]. Soybean Science, 2012, 31 (6): 887-893.)

[17] 孙君明,韩粉霞. 植物次生代谢产物异黄酮的调控机理 [J]. 西南农业学报, 2005, 18 (5): 663-667. (Sun J M, Han F X. Manipulating mechanism of secondary metabolites-isoflavone in plant [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2005, 18 (5): 663-667.)

[18] 孟凡立,李文滨,段玉玺,等. 大豆蚜虫抗性鉴定技术及抗性资源筛选 [J]. 大豆科学, 2010, 29 (3): 457-460. (Meng F L, Li W B, Duan Y X, et al. Identification techniques and screening of soybean aphid resistant germplasm [J]. Soybean Science, 2010, 29 (3): 457-460.)

黑龙江启动玉米改种大豆轮作补贴 每亩补贴 150 元

从黑龙江省农委获悉,黑龙江省已经开展玉米改种大豆轮作补贴试点工作,进一步调动新型经营主体玉米改种大豆轮作的积极性,补贴标准为每亩 150 元。

根据《2016 年黑龙江省玉米改种大豆轮作补贴试点工作实施方案》,玉米改种大豆轮作指前茬是玉米,今年种植大豆。补贴对象为,2015 年在合法农业用地上种植籽粒玉米,2016 年种植大豆进行合理轮作,以种植大户、家庭农场、农民专业合作社等新型农业经营主体为实际的种植者。

据悉,本次玉米改种大豆轮作补贴试点面积为 650 万亩。优先支持种植大户、家庭农场、农民专业合作社等新型农业经营主体调减玉米改种大豆。补贴标准为每亩 150 元。

“方案”规定,黑龙江省各市县市区、农垦总局可根据本地实际情况,自主确定种植大户、家庭农场、农民合作社等新型经营主体为主的补贴对象门槛。在国家和省有明确退耕要求的土地和未经批准开垦的土地,或者在禁止开垦土地上的玉米改种大豆轮作面积,不享受本次补贴。

转自《新华社》