



# 大豆胞囊线虫胁迫下 *GmCHS* 基因表达及异黄酮含量变化分析

王 爽<sup>1</sup>, 张顺斌<sup>1</sup>, 王旭东<sup>1</sup>, 于佰双<sup>2</sup>, 陈井生<sup>3</sup>, 王 惠<sup>1</sup>, 段玉玺<sup>4</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316; 4. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:** 异黄酮作为植保素, 在生物因素、非生物因素的胁迫下, 都发挥着重要抗逆作用, 而查尔酮合成酶(CHS)是异黄酮形成途径中的关键位点, 为研究 *GmCHS* 在大豆胞囊线虫胁迫下的响应表达, 以便进一步揭示大豆抗大豆胞囊线虫的分子机理, 本研究选取抗病品种灰皮支黑豆和感病品种 Williams 82, 在大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫后的不同时期检测 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8*、*CHS9* 基因的表达, 并测定其下游产物异黄酮成分中的大豆苷元和黄豆黄素的含量。结果显示: 感病品种中 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8*、*CHS9* 基因的相对表达量变化程度较抗病品种小。胁迫 5 d 时, 抗病品种中 4 个查尔酮合成酶基因均明显上调表达, 与实验室前期大豆转录组测序中 *CHS7*、*CHS8* 均上调表达结果一致。进一步对两个品种主要异黄酮成分含量的检测结果表明, 大豆苷元相较于黄豆黄素在大豆胞囊线虫胁迫下响应更加敏感, 其中大豆苷元在 Williams 82 无响应, 而在灰皮支黑豆接种 5, 10, 15 d 均出现了显著差异, 可见异黄酮中的大豆苷元很可能是响应大豆胞囊线虫胁迫的重要成分之一。因此, 初步认为 *CHS* 基因在抗大豆胞囊线虫的抗性机制中具有重要作用。

**关键词:** 大豆; 大豆胞囊线虫; 查尔酮合成酶; 差异表达基因; 异黄酮

## Expression Analysis of *GmCHS* Gene and Isoflavone Content Changes Under Soybean Cyst Nematode Stress

WANG Shuang<sup>1</sup>, ZHANG Shun-bin<sup>1</sup>, WANG Xu-dong<sup>1</sup>, YU Bai-shuang<sup>2</sup>, CHEN Jing-sheng<sup>3</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, DUAN Yu-xi<sup>4</sup>

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China; 4. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** As phytoalexin, under the stress of biotic and abiotic factors, isoflavones play an important role in resisting stress. Chalcone synthase (CHS) is a key site in isoflavone formation pathway, CHS response expression under soybean cyst nematode stress, it is beneficial to further reveal the molecular mechanism of soybean resistance to soybean cyst nematode. In this study, we selected disease-resistant varieties of Huipizhi Heidou and susceptible varieties of Williams 82 as the research objects. The expressions of *CHS5*, *CHS7*, *CHS8* and *CHS9* were detected at different periods after the treatment of soybean cyst nematode race 3, and the content of daidzein and glycitein in the downstream product isoflavones were determined. According to the results, the relative expression of *CHS5*, *CHS7*, *CHS8* and *CHS9* genes in susceptible varieties changed less than resistant varieties. At 5 day of stress, the 4 *CHS* genes in the disease-resistant cultivars were all significantly up-regulated, which was consistent with the up-regulated expression results of *CHS7* and *CHS8* of soybean transcriptome sequencing. Under the stress of SCN3, combined with soybean transcriptome sequencing analysis results showed that *CHS7* and *CHS8* up-regulated expression. Further detection of the content of the main isoflavone components of the 2 varieties showed that daidzein was more sensitive to the response of soybean cyst nematode than glycitein. Among them, daidzein did not respond to Williams 82, however, there were significant differences in the 5, 10 and 15 days of the inoculation of the Huipizhi Heidou. It could be seen that the daidzein in isoflavones was likely to be one of the important components in response to soybean cyst nematode stress. Therefore, it was preliminarily believed that the *CHS* gene plays an important role in the resistance mechanism of soybean cyst nematode.

**Keywords:** Soybean; Soybean cyst nematode; Chalcone synthase; Differential expression gene; Isoflavone

大豆胞囊线虫(SCN)是影响大豆的主要病原体之一<sup>[1]</sup>, 大豆胞囊线虫病是大豆生产中危害最大的病害之一。种植抗病品种是世界上公认的防治大

豆胞囊线虫病最经济有效的方法。大豆胞囊线虫是植物内寄生线虫, 以大豆根为食, 严重破坏大豆根部的生长, 导致大豆根部的吸收受阻, 影响植株

收稿日期: 2020-07-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31330063)。

第一作者: 王爽(1994—), 女, 在读硕士, 主要从事大豆胞囊线虫抗性基因相关研究。E-mail: 1145328920@qq.com。

通讯作者: 王惠(1972—), 博士, 副教授, 主要从事大豆抗病、抗逆机制和分子生物学研究。E-mail: wanghuisyau@sina.com;

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



的生长状态,进而会直接影响大豆的产量。据联合国粮食及农业组织(FAO)保守估计,世界上因线虫造成的大豆产量损失为 12.7% ~ 20.0%<sup>[2]</sup>。大豆胞囊线虫会随着大豆的种植而扩散<sup>[3]</sup>,因此其危害不容小觑。

异黄酮属于黄酮类化合物大家族中特别的亚类,主要存在于豆科植物蝶形花亚科、苋科、蔷薇科、鸢尾科等植物中<sup>[4]</sup>,在大豆和豌豆中的含量最为丰富。异黄酮类化合物包括多种次级代谢产物,它们是从苯丙烷类途径衍生而来,主要分布在豆科植物中。这类化合物在植物与环境的相互作用中起着至关重要的作用<sup>[5]</sup>,与此同时异黄酮在植物抗病性中也发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。郭春红<sup>[8]</sup>的研究显示,异黄酮对大豆胞囊线虫的二龄幼虫(J2)时期和胞囊时期经过不同浓度毒杀的情况不同,异黄酮的浓度越大,对于 J2 和胞囊的毒杀效果越明显,且经田间试验,进一步验证了这一结果。

查尔酮合酶(CHS)是 III 型聚酮化合物合酶(PKS)的最简单代表<sup>[9]</sup>,属于 III 型聚酮化合物合酶家族,存在于大多数植物中<sup>[10]</sup>。Hutangura 等<sup>[11]</sup>研究发现,在接种后 120 h 内,根结线虫体内的 CHS1 和 CHS2(类黄酮生物合成中的第一种酶)的诱导在空间和时间上与生长素反应的增加相吻合。而类黄酮可以早期被线虫在觅食部位所利用并用于发育,进而促进生长素的积累,可见类黄酮也是线虫胁迫的响应因子之一。类黄酮在抑制和杀死病原体中发挥巨大作用,Zhi 等<sup>[12]</sup>研究了在柑橘中 CHS 成员的数量及其对类黄酮生产的影响。利用病毒诱导的基因沉默(VIGS),以验证 3 个 *CuCHS* 基因的功能。CHS 沉默诱导信号进行负调控,通过影响木质素从而导致细胞壁结构的改变<sup>[13]</sup>。查尔酮合酶(CHS)为该途径中首个固定酶<sup>[14]</sup>,因此推测 CHS 具有一定的抗线作用。

苯丙烷代谢产生的黄酮类化合物是植物抵御逆境的重要代谢产物,预试验发现大豆胞囊线虫感病品种 Williams 82 和抗病品种灰皮支黑豆接种 J2 后 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 基因表达量与未接种线虫植株有显著差异。同时,预试验用 J2 侵染 Williams 82 和灰皮支黑豆 15 d 后,对大豆根部染料木苷(genistin)、染料木黄酮(genistein)、大豆苷(danizin)、大豆苷元(danizein)、黄豆黄苷(glycitin)、黄豆黄素(gycitein)异黄酮进行检测,发现只有大豆苷元、黄豆黄素在大豆根部存在。因此本研究从异黄酮抗逆出发,围绕异黄酮合成的第一固定酶 CHS 为研究中心,并结合前期对灰皮支黑豆接种 J2(二龄幼虫)后 5,10 和 15 d 的根部转录组测序结

果<sup>[15]</sup>分析在大豆胞囊线虫胁迫下 *CHS* 候选基因 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 在抗、感病品种中的响应规律,并以大豆苷元和黄豆黄素含量测定结果进行验证,旨在探讨异黄酮的抗线虫机理,挖掘在大豆抗胞囊线虫过程起调控作用的 *CHS* 候选基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试大豆 大豆胞囊线虫感病品种 Williams 82 和抗病品种灰皮支黑豆。

1.1.2 供试线虫 大豆胞囊线虫 3 号生理小种(SCN3)J2,由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

### 1.2 试验设计

大豆种子用 5.25% 次氯酸钠溶液表面消毒 5 min,用 75% 无水乙醇浸泡 5 min,再用无菌水冲洗 10 次。将种子放入含有灭菌蛭石的花盆中培养,并加入适量的无菌水于人工气候室(湿度:45%,温度 22 ℃)中培养,定期浇灭菌水。待大豆苗长至两片真叶时,清洗长势相同的植株。将孵育的 SCN3 J2 从 4 ℃ 冰箱中提前 8 h 取出,使其具有侵染活性,制备包含约 1 500 条·mL<sup>-1</sup> J2 的 0.1% 琼脂悬浮液。将两个品种的大豆幼苗分别转移至含有灭菌细沙的试管(长 14 cm、直径 4 cm)中,将含有线虫的琼脂悬浮液淋到大豆根部,使其充分接触,设置不接种对照。分别于接种后 1,2,3,4,5,10 和 15 d 取接种与不接种的抗、感病大豆品种植株根系为处理组与对照组,每个处理各随机取 3 株。将豆苗根系冲洗干净并用吸水纸吸干,用作好标记的铝箔纸包好,立即于液氮中冷冻,转至 -80 ℃ 冰箱中保存,用于 RNA 提取,每个样品 3 次重复。

分析 Williams 82、灰皮支黑豆根部不同时期 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 的相对表达量,根据灰皮支黑豆转录组测序结果,分析可能与 CHS 互作蛋白在 5,10,15 d 的相对表达量,在 KEGG 数据库搜索目的 *CHS* 基因在黄酮合成通路中的作用位点,并检测大豆苷元和黄豆黄素的含量。

### 1.3 方法

1.3.1 大豆总 RNA 提取及 cDNA 的合成 采用植物 RNA 提取试剂盒(康为世纪)提取大豆根部 RNA;并利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取效果。

使用 Prime Script First-Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa,中国大连)合成 cDNA。

1.3.2 qRT-PCR 检测 根据 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>)中 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 基因序列,利用 NCBI Primer Blast 在线软件设计荧光定量 PCR 引物,其中基因登陆号详见表 1。



表 1 *CHS* 基因序列号  
Table 1 *CHS* gene sequence number

名称 Name	登录号 Accession	上游引物 Upstream primer	下游引物 Downstream primer
<i>CHS5</i>	NM_001360359.1	TTGAAGAGATCCGTCAGGCAC	GACTTATCACACATGCGTTTGAAT
<i>CHS7</i>	NM_001353380.1	ATCAAATCGCATTGGTATCTGAAA	ACTTGTACACATGCGCT
<i>CHS8</i>	NM_001317656.2	AAATTCCAGCGCATGTGTGA	TTATGGCCTTTACTGCAGCCT
<i>CHS9</i>	NM_001371377.1	GCACTGCCACTCCTCCAAA	TCGACTTATCACACATGCGCT

选用 *Acting11* 作为内参基因<sup>[16]</sup>,*Acting11*F:CG-GTGGTTCTATCTTGGCATC,*Acting11*R:GTCTTTCGC-TCCAATAACCCTA。按照 Takara 试剂盒 (RR420Q) 配制实时荧光定量 PCR 反应体系:总体系 20 μL,其中,上游引物 4 μL、下游引物 4 μL、cDNA 模板 2 μL、TB Green 10 μL。

反应程序:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,40 个循环;60 ℃ 30 ~34 s。

1.3.3 互作蛋白分析 根据转录组测序数据分析主要差异表达 *CHS* 基因在黄酮合成通路中的作用位点。以 *CHS* 序列作为搜索条件在 String 中进行分析,在 String 的 2 度共表达数据库中搜索相关互作蛋白。在高置信区间 (interaction score ≥0.700) 筛选互作蛋白。

1.3.4 HPLC 检测抗、感大豆品种中异黄酮含量 采用安捷伦 Agilent 1260 高效液相色谱,检测两个大豆品种中主要异黄酮成分。色谱柱:Eclipse XDB-C18(4.6 ×250 mm,5 μm)。高效液相色谱程序:流动相:梯度(甲醇-水)A 水 D 甲醇,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 40 ℃,进样量 20 μL。0 min - 25% 甲醇;20 min - 25% 甲醇;30 min - 30% 甲醇;40 min - 45% 甲醇;50 min - 65% 甲醇;60 min - 55% 甲醇;70 min - 35% 甲醇;80 min - 25% 甲醇。

1.4 数据分析

采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法对 qRP-PCR 结果进行分析,计算两个大豆品种根部不同时期 *CHS* 的相对表达量。

表达倍数(处理组/对照组) = 2<sup>-ΔΔCt</sup>,其中 ΔΔCt = (处理组基因表达 ΔCt 值 - 处理组内参基因表达 ΔCt 值) - (对照组基因表达 ΔCt 值 - 对照组内参基因表达 ΔCt 值)。利用 GRAPHPAD 进行 ANOVA 方差分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度检测

如图 1 所示,RNA 的条带包含 28S、18S,且条带清晰完整无降解,可用于后续试验。



图 1 RNA 琼脂糖电泳图  
Fig. 1 RNA agarose electrophoresis

2.2 qRT-PCR 结果

如图 2 所示,与未接种线虫的对照组相比,接种线虫的 Williams 82 中 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 基因表达水平同对照差异较小。在 1 和 2 d 时,*CHS7* 与 *CHS8* 下调表达,*CHS9* 在 2 d 时较少表达。在 3 和 4 d 时 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 的表达量上调,为对照组的 1.1 ~1.3 倍。在 10 d 时 *CHS5* 和 *CHS9* 下调表达。总体来说,虽然 Williams 82 的 *CHS* 基因在线虫胁迫下不同时期内表达有波动,但其表达量变化微小,可推断 *CHS* 在感病品种 Wil-liams 82 不同发育阶段中对线虫侵染不敏感。

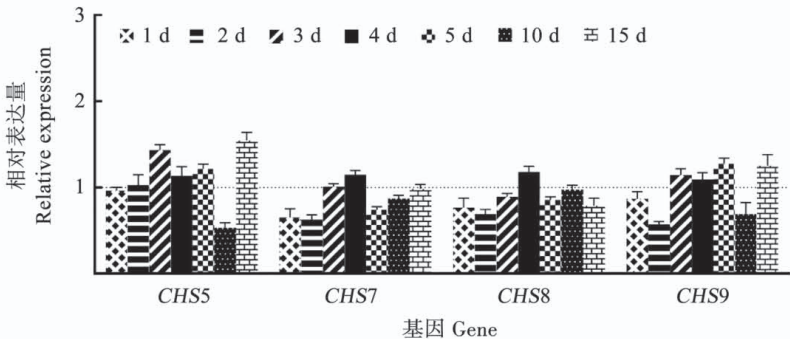


图 2 SCN3 胁迫不同时间 Williams 82 中 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 基因的相对表达量  
Fig. 2 The relative expression of *CHS5*, *CHS7*, *CHS8* and *CHS9* genes in Williams 82 of different time under SCN3 stress

如图3所示,接种线虫的灰皮支黑豆中 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 基因表达水平与未接种对照差异较大。*CHS5* 在 1 d 时上调 1.8 倍,5 d 时上调表达 4.54 倍;*CHS7* 在 5 d 时上调表达 1.99 倍;*CHS8* 在 5 d 时上调表达 2.44 倍;*CHS9* 在 5 d 时上调表达 3.57 倍,在 10 d 时上调 2.75 倍。在 10 和 15 d 时线

虫发育到 J4 时期候选 *CHS* 基因的表达量开始回落至与对照组不显著水平。总体来说,最显著的为 5 d,*CHS5*、*CHS7*、*CHS8*、*CHS9* 表达量显著升高,其中 *CHS5* 在 5 d 上调表达最高为 4.54 倍。说明在抗病品种灰皮支黑豆中 *CHS* 基因对线虫的侵染与发育阶段更敏感。

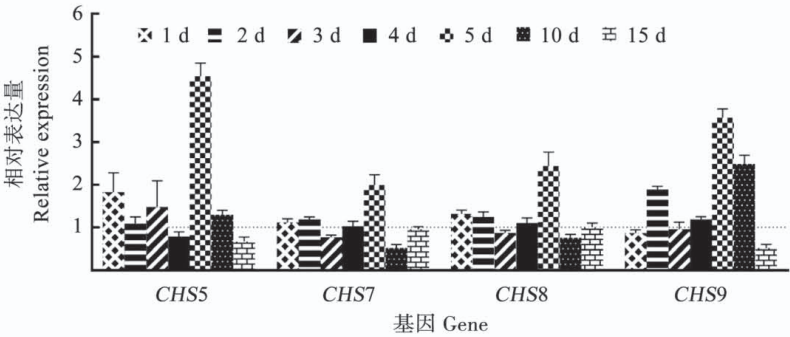


图3 SCN3胁迫下灰皮支黑豆中*CHS5*、*CHS7*、*CHS8*、*CHS9*基因的相对表达量  
Fig. 3 Relative expression of *CHS5*, *CHS7*, *CHS8* and *CHS9* genes in Huipizhi Heidou under SCN3 stress

2.3 蛋白互作 mRNA 表达量

在高置信区间(interaction score ≥ 0.700)共筛选出 10 个蛋白,为脂酰 CoA 合成酶(AASDH)、黄腐酚 4'-O-甲基转移酶(OMT5)、4-香豆酸酯-CoA 连接酶(4CL)、2-羟基异黄烷酮脱水酶(HID)、黄酮醇合酶(FLS1)、查尔酮异构酶(CHI)、黄酮 4-还原酶(DFR2)、异黄酮合成酶(IFS)、柚皮素 3-双加氧酶(F3H)和花青素合酶(ANS)。

将网络的节点与灰皮支黑豆的转录组数据比对分析,相对表达量计算结果如图4所示,筛选出差异表达基因:*CHS8*、*CHS7*、*CHI2A*、*CHI4A*、*OMT-5*、*4CL3*、*4CL4* 和 *HIDH*。差异表达基因在 5,10 或 15 d 中的至少 1 个时间点上调表达,但表达模式不完全相同。其中,*CHS7* 与 *CHS8* 在线虫定殖与发育期(5 和 10 d)上调表达,而下游 *CHI4A* 和 *CHI2A* 在发育与性别分化期(10 和 15 d)上调表达,*OMT-5* 和 *HIDH* 在发育期(10 d)上调表达。

2.4 抗、感大豆品种中大豆苷元和黄豆黄素的含量

2.4.1 大豆苷元含量变化 接种线虫的 Williams 82 中大豆苷元的含量呈递增趋势,1 和 2 d 时大豆苷元处理组和对照组均无含量变化,3,4,5,10 和 15 d 的处理组和对照组中含量逐渐增加,但处理组和对照组含量无明显差异,可见感病品种中大豆苷元对线虫响应不积极。15 d 对照组和处理组的含量均比 1,2,3,4,5 和 10 d 的含量高,推测感病品种中大豆苷元含量随着时间的变化逐渐增高是大豆生长发育所影响,这一推测有待进一步验证。大豆苷元在灰皮支黑豆中的含量呈递增趋势,其中抗病品种处理组在 1,2 和 3 d 相对感病品种明显表达,而线虫

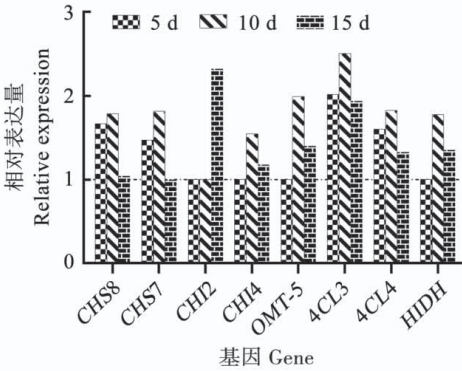


图4 SCN3胁迫下灰皮支黑豆转录组差异表达基因的相对表达量分析

Fig. 4 Analysis on the relative expression of differentially expressed genes in transcriptome in Huipizhi Heidou under SCN3 stress

在 1,2 和 3 d 为植物根部入侵期,可见抗病品种在 J2 入侵初期可能有抗性作用。其中在 4,5 和 15 d 处理组和对照组大豆苷元含量均增加但处理组含量明显高于对照组(图5)。整体来说,接种线虫后,大豆苷元在灰皮支黑豆和 Williams 82 中的含量均有不同程度的响应,但抗病品种处理组中大豆苷元的响应明显优于感病品种,而感病品种中大豆苷元的产生可能是由于植物自身发育导致的,具体机制需要后续试验验证分析。

2.4.2 黄豆黄素含量变化 接种线虫的 Williams 82 中黄豆黄素的含量变化呈递增趋势,1 和 2 d 时黄豆黄素处理组和对照组均无含量变化,3,4,5 和 10 d 的处理组和对照组中含量逐渐增加,且在 15 d 处理组的含量最高,是对照组的 4.27 倍,处理组含量明显高于对照组。因此认为,在接种大豆胞囊线虫 15 d,



黄豆黄素响应最为明显。黄豆黄素在灰皮支黑豆中的含量呈递增趋势,其中抗病品种处理组在 1,2 和 3 d 时相对感病品种有明显表达,而线虫在 1,2 和 3 d 时为植物根部入侵期,可见抗病品种在 J2 发育初期可能有抗性作用,其中在 4,5 和 15 d 处理组黄豆黄素含量均增加(图 6)。整体来说,黄豆黄素在 Williams 82 和灰皮支黑豆中的含量有不同程度的响应,且处理组的含量高于对照组。15 d 时 Williams 82 和灰皮支黑豆在 SCN3 的诱导下黄豆黄素的表达量比对照组明显提高,但在感病品种处理组含量却比抗病品种中处理组含量高,推测可能是由于感病品种相对于抗病品种适应逆境条件的能力较弱,容易受到环境中各种不利因素的叠加影响,

故而黄豆黄素的含量变化发生叠加,具体机制需要后续试验进一步验证分析。

2.4.3 总异黄酮含量变化 大豆昔元和黄豆黄素的总含量(总异黄酮含量)变化如图 7 所示,Williams 82 经大豆胞囊线虫侵染后 1 和 2 d 总异黄酮含量为 0,随着天数的增加,异黄酮在处理组中呈递增趋势。灰皮支黑豆中线虫侵染后 1 d 异黄酮即被检测出来,而对照组则没有含量变化,且异黄酮含量在处理组中呈递增趋势。在抗病品种灰皮支处理组中 5 d 含量明显高于对照组。因此认为,抗病品种灰皮支黑豆在前期高度响应大豆胞囊线虫的入侵,且响应 SCN3 的发育过程。

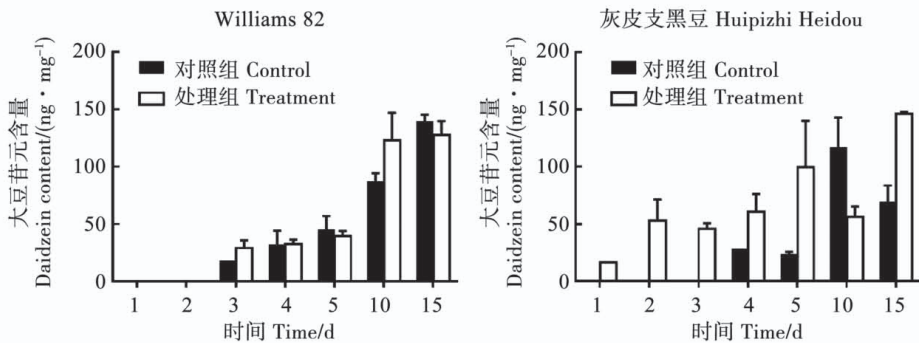


图 5 SCN3 胁迫下 Williams 82 和灰皮支黑豆中大豆昔元的含量

Fig. 5 Daidzein content in Williams 82 and in Huipizhi Heidou under SCN3 stress

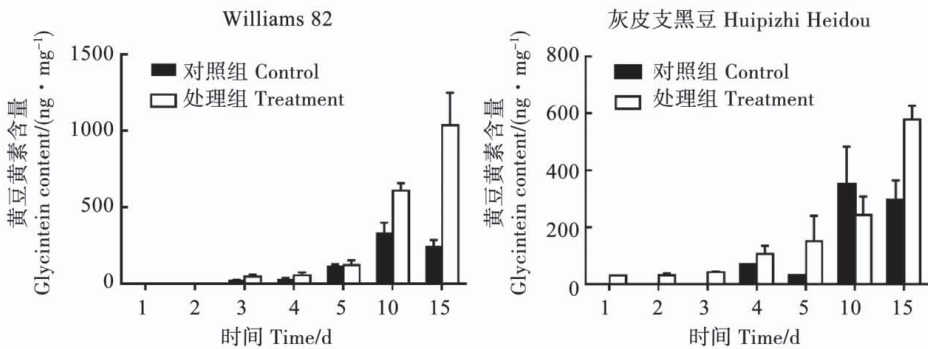


图 6 SCN3 胁迫下 Williams 82、灰皮支黑豆中黄豆黄素的含量

Fig. 6 Glycitein content in Williams 82 and in Huipizhi Heidou under SCN3 stress

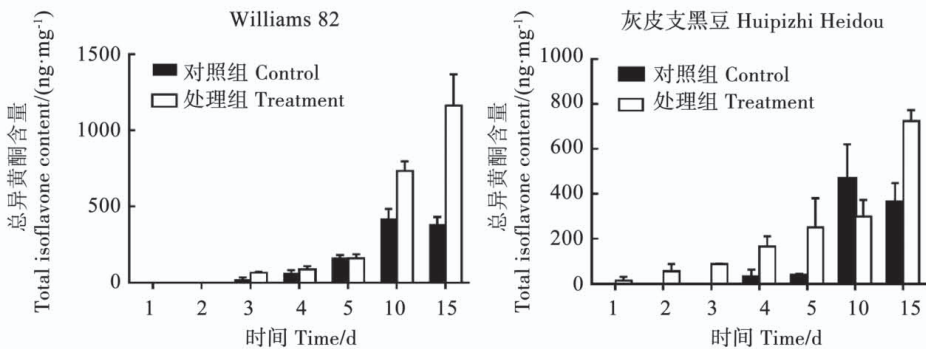


图 7 SCN3 胁迫下 Williams 82 和灰皮支黑豆中总异黄酮含量

Fig. 7 Total isoflavone content of Williams 82 and in Huipizhi Heidou under SCN3 stress



3 讨论

大豆胞囊线虫防治方法主要包括轮作、生物防治、分子生物学育种等,其中利用分子育种筛选抗性候选基因,明确抗性机制是大豆胞囊线虫抗性领域的一大研究热点。异黄酮属于类黄酮,作为植保素,类黄酮能为植物提供有效的防护。大豆异黄酮是高度可变且经多基因协同作用生成的<sup>[17]</sup>,在整个植物、器官、组织、细胞和分子水平上均得到调节<sup>[12]</sup>。而查尔酮合酶是类黄酮合成的首个固定酶<sup>[18]</sup>,杨悦<sup>[13]</sup>前期已经对 *GmCHS* 进行了初步验证,说明 *GmCHS* 具有潜在的抗大豆胞囊线虫的作用。

本研究从苯丙烷代谢出发,分析了异黄酮生物合成过程中查尔酮合酶在大豆胞囊线虫胁迫下的响应规律,探讨了异黄酮的抗线虫作用。研究结果显示,灰皮支黑豆的 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 基因在接种后第 5 天均明显上调表达,结合 *SCN3* 生长发育情况,在接种第 5 天时线虫可能在植物体内逐步向 J3 发育<sup>[19]</sup>,推测 *CHS* 基因在抗病品种中可能通过影响大豆胞囊线虫在维管组织的发育发挥抗线虫作用。

结合蛋白互作分析,在 *CHS7* 和 *CHS8* 上调表达的同时,*CHI4A* 在 10 和 15 d 也上调表达,进而影响下游异黄酮在 10 和 15 d 的含量变化。以 *CHS* 为界将这些蛋白分为“在 *CHS* 上游并与其共表达的蛋白”和“在 *CHS* 下游并与其共表达的蛋白”分别讨论其功能的关联。一方面,在 *CHS* 上游并与其共表达的蛋白:在 *CHS* 上游,4CL 与 C4H 是合成香豆素 C4L 和 C4H 并催化香豆酰 CoA 和肉桂酰 CoA 的关键酶,4CL 与 *CHS* 的共表达关系证明了苯丙烷代谢同黄酮(flavonoid)生物合成的高度关联。另一方面,在 *CHS* 下游并与其共表达的蛋白:查尔酮异构酶(*CHI*)是位于 *CHS* 下游的异构酶,*CHS* 被 *CHI* 进一步转化为黄烷酮,其中柚皮素是黄酮和异黄酮代谢的底物,异黄酮皂苷元进入豆类特异性异黄酮分支。*CHS* 和 *CHI* 既是异黄酮代谢途径的关键位点,又通过黄酮的途径形成黄酮产物<sup>[20]</sup>。*CHS* 下游是黄酮生物合成途径、黄酮与黄酮醇生物合成途径和异黄酮生物合成途径,在互作网络中,由于 *CHS*-*CHI*-*F3H*-*DFR* 的共表达,推测黄酮物质作为相关代谢物可能与线虫侵染和定殖相关。其中这些黄酮物质包括短叶松黄烷酮(pinobanksin)、高良姜素(galangin)、佛提素(fustin)和三羟基黄烷酮(garbanzol)。在 *CHS*-*CHI*-*F3H*-*FLS*-*ANS* 途径中,存在花葵苷(pelargonidin)、矢车菊素(cyanidin)和花翠

素(delphinidin)等黄酮物质,都可能与线虫侵染、定殖相关。其中 *4CL3* 和 *4CL4* 在异黄酮生物合成途径的 3 个时期均上调表达。参与异樱花素合成的 *OMT-5* 和 *HIDH* 在 10 和 15 d 上调表达。查尔酮还原酶(*CHR*)的特定同工酶与 2-羟基异黄酮合酶相互作用,查尔酮合酶(*CHS*)也可以与 2-羟基异黄酮合酶结合,可防止在不稳定 *CHR* 底物从 *CHS* 转移至 *CHR* 期间损失<sup>[21]</sup>。因此,在苯丙烷代谢途径中,存在庞大而复杂的路径影响下游产物的表达。本研究结果明确异黄酮的含量变化与上述分析一致,初步说明 *CHS* 基因在抗病品种抗性机制中的重要作用。

此外,*CHS* 基因过表达还具有多方面的原因,一方面紫外、LED、UV-B1 调控使 *CHS* 基因高度表达,且下游产物均高度表达<sup>[22-24]</sup>。另一方面,受到生物胁迫如根结线虫胁迫后 *CHS* 基因表达量发生变化<sup>[24]</sup>。而花期形成花素的研究也表明 *CHS* 参与花色素的形成<sup>[13]</sup>,也使 *CHS* 基因的表达受到影响<sup>[25-26]</sup>。本研究结果表明,抗病品种灰皮支黑豆中,在 J2 接种 5 d 时 4 个 *CHS* 基因均出现上调表达,说明 *CHS* 基因是响应线虫胁迫的重要抗性候选基因,研究结果可为后续基因功能研究提供理论依据。

4 结论

本研究围绕苯丙烷代谢途径异黄酮生物合成的关键酶 *CHS* 进行研究,分析了该基因在大豆胞囊线虫胁迫下的响应规律和下游生物含量变化,并结合蛋白质互作对该基因的抗线虫活性进行研究。对前期预测筛选出的 4 个候选基因 *CHS5*、*CHS7*、*CHS8* 和 *CHS9* 进行相对表达量变化分析,结果显示候选基因在抗病品种中均有不同程度的差异性表达,且集中在接种后的第 5 天,而感病品种并无差异性变化,推测 *CHS* 发挥抗线虫活性可能是通过前期合成异黄酮、抑制线虫在维管组织的发育实现的。而高效液相色谱测定的黄豆黄素和大豆苷元的含量显示,大豆苷元在灰皮支黑豆中的含量在 1,2 和 3 d 时相对感病品种明显增加,由此可知,异黄酮中的大豆苷元很可能是响应大豆胞囊线虫胁迫的重要成分之一,在 J2 侵染初期产生一定的抗性作用,而黄豆黄素并无明显规律,推测其可能不参与抗线虫作用或对线虫不敏感。

参考文献

[1] Zhao J, Liu D, Wang Y Y, et al. Evaluation of *Bacillus aryabhattai* Sneh517 for control of *Heterodera glycines* in soybean



- [J]. *Biological Control*, 2020, 142: 104147.
- [2] Waki T, Yoo D, Fujino N, et al. Identification of protein-protein interactions of isoflavonoid biosynthetic enzymes with 2-hydroxyisoflavanone synthase in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2016, 469(3): 546-551.
- [3] Russin J S, Layton M B, Boethel D J, et al. Development of *Heterodera glycines* on soybean damaged by soybean looper and stem canker [J]. *Journal of Nematology*, 1989, 21(1): 108-114.
- [4] 邢军, 李友广, 谢丽琼. 黄酮类化合物——植物异黄酮的研究进展与展望 [J]. *新疆大学学报(自然科学版)*, 2006(2): 207-210. (Xing J, Li Y G, Xie L Q, et al. Study development and expectation of isoflavones in plants-compounds of flavonoids [J]. *Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition)*, 2006(2): 207-210.)
- [5] 邱佳文. 生防根瘤菌 Sneb183 调控大豆异黄酮代谢抗胞囊线虫机理研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018. (Qiu J W. Biocontrol rhizobium Sneb183 regulates soybean [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018.)
- [6] Cheng Q, Li N, Dong L, et al. Overexpression of soybean isoflavone reductase (GmIFR) enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean [J]. *Front Plant Science*, 2015, 6: 1024.
- [7] Graham T L, Graham M Y, Subramanian S, et al. RNAi silencing of genes for elicitation or biosynthesis of 5-deoxyisoflavonoids suppresses race-specific resistance and hypersensitive cell death in *Phytophthora sojae* infected tissues [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(2): 728-740.
- [8] 郭春红. 异黄酮在大豆抗胞囊线虫过程中的作用研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017. (Guo C H. Function of soybean isoflavones on induced resistance to soybean cyst nematode [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.)
- [9] Anguraj V A K, Krysiak K, Tian G, et al. Genome-wide identification and localization of chalcone synthase family in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 325.
- [10] Jez J M, Noel J P. Mechanism of chalcone synthase. pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(50): 39640-39646.
- [11] Hutangura P, Mathesius U, Jones M G K, et al. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway [J]. *Functional Plant Biology*, 1999, 26(3): 221-231.
- [12] Zhi B W, Qi B Y, Wan X S, et al. Functional study of *CHS* gene family members in citrus revealed a novel *CHS* gene affecting the production of flavonoids [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 189.
- [13] 杨悦. *GmCHS* 基因生物信息学分析及过表达载体构建 [J]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017. (Yang Y. *GmCHS* bioinformatics analysis and delivery vector construction [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.)
- [14] Verhoeven M E, Bovy A, Collins G, et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(377): 2099-2106.
- [15] 李爽. 灰皮支黑豆抗大豆胞囊线虫转录组及蛋白质网络研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018. (Li S. Study on transcriptome and protein interaction network of Huipizhi Heidou resistance to soybean cyst nematode [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018.)
- [16] 王超. 响应大豆胞囊线虫胁迫的 *GmMIPS* 基因的表达分析及亚细胞定位的研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019. (Wang C. Expression analysis of *GmMIPS* gene and subcellular localization under SCN stress [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.)
- [17] Ng J L, Perrine-Walker F, Wasson A P, et al. The control of auxin transport in parasitic and symbiotic root-microbe interactions [J]. *Plants (Basel)*, 2015, 4(3): 606-643.
- [18] Wang Z, Yu Q, Shen W, et al. Functional study of *CHS* gene family members in citrus revealed a novel *CHS* gene affecting the production of flavonoids [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 189.
- [19] 孙家骥. 灰皮支黑豆抗胞囊线虫谷胱甘肽合成途径相关基因的克隆与表达分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016. (Sun J J. Cloning and expression analysis glutathione synthesis related genes for the Huipizhi Heidou resistant to *Heterodera glycines* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.)
- [20] Lyle R, Senthil S, Michiyo M, et al. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(4): 1375-1388.
- [21] Ryo M, Toshiyuki W, Yosuke K, et al. Involvement of chalcone reductase in the soybean isoflavone metabolism: Identification of GmCHR5, which interacts with 2-hydroxyisoflavanone synthase [J]. *The Plant Journal*, 2018, 96(1): 56-74.
- [22] Fan C, Hu H, Wang L, et al. Enzymological mechanism for the regulation of lanthanum chloride on flavonoid synthesis of soybean seedlings under enhanced ultraviolet-B radiation [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2014, 21(14): 8792-8800.
- [23] Yang L, Zhang J C, Qu J T, et al. Expression response of chalcone synthase gene to inducing conditions and its effect on flavonoids accumulation in two medicinal species of *Anoectochilus* [J]. *Science Report*, 2019, 9(1): 20171.
- [24] Hutangura P, Mathesius U, Jones M G K, et al. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway [J]. *Functional Plant Biology*, 1999, 26(3): 221-231.
- [25] 甘林鑫. 三种色系牡丹花色色素组成及相关基因表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019. (Gan L X. Analysis of the composition of three color peony anthocyanins and related gene expression [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.)
- [26] 梁先利. 陆地棉叶色突变体花青素代谢及 *GhCHS*, *GhLAR* 和 *GhANR* 基因功能的初步分析 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2019. (Liang X L. The preliminary study of anthocyanin metabolism and *GhCHS*, *GhANR* and *GhLAR* in leaf color mutants of *Gossypium hirsutum* L. [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2019.)