

胞囊线虫侵染不同抗性大豆品种根系的组织病理学差异研究

刘 鹤,王媛媛,朱晓峰,刘晓宇,陈立杰,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:为明确对大豆胞囊线虫病具有不同抗性的小黑豆品种的抗性机制,利用石蜡切片技术对线虫侵染不同抗性大豆品种根系的组织病理学差异进行了研究。结果表明:在侵染初期,抗感品种侵入根内的线虫数量没有明显差异,抗病品种形成合胞体的时间要早于感病品种辽豆 15,哈尔滨小黑豆较早在中柱内形成了合胞体,抗侵入能力较弱。随着线虫的侵染,抗病品种逐渐形成过敏性坏死反应,阻止线虫发育使根内形成非常少量的雌虫,其中灰皮支黑豆根内几乎没有雌虫形成,抗发育能力最强。感病品种辽豆 15 根内没有发生过过敏性坏死反应形成了大量雌虫。在寄主维管束中,侵染后期中柱内形成的合胞体会使感病品种辽豆 15 木质部外移,根内导管数量减少,不利于水分运输的安全性。而 3 个抗病品种小黑豆的木质部组织结构没有发生病变,利于大豆的正常生长。

关键词:大豆;合胞体;大豆胞囊线虫

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0795

Comparative Histological Structure of Different Resistant Soybean Roots to Soybean Cyst Nematode

LIU He, WANG Yuan-yuan, ZHU Xiao-feng, LIU Xiao-yu, CHEN Li-jie, DUAN Yu-xi
(Plant protection college/Nematode Institute of Northern China, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Paraffin sections technique were used to compare the histological structure of different resistant soybean roots, aiming to determine the resistance mechanism of different small black soybean cultivars. The result showed that in the early days of infection there was no significant difference in the number of second stage juveniles inside soybean roots between different resistant cultivars. The formation of syncytium in the resistant cultivars was earlier than susceptible cultivars. Harbin small black soybean early formed the syncytial in stele and hardly resistant the invasion. With the nematode infection, resistant cultivars evolved hypersensitive reaction to prevent nematode development forming a very small number of female in roots where almost no females formed in Huipizhi Heidou root, the strongest anti-development. Susceptible cultivar Liaodou 15 had no hypersensitive response occurred within the root formation of a large females. In the host's vascular bundles, the xylem of susceptible cultivar Liaodou 15 moved outward and the xylem vessel would be reduced in the late infection that was not conducive to the safety of water transportation. However, the structure of xylem didn't change in the three resistant cultivars and was good for the growth of soybean.

Keywords: Soybean; Syncytium; Cyst nematode

大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe, SCN) 是世界上危害大豆产量最严重的病原物之一。它具有危害严重,分布范围广泛,休眠体在土壤中存活时间长,容易传播的特点。在我国该病害广泛分布于东北和黄淮海等几个主要的大豆产区可以使大豆减产 5%~10%, 严重者可以达到 30% 以上,甚至绝产^[1]。据统计,大豆胞囊线虫病在世界上广泛流行于美国、日本、俄罗斯等国家,甚至巴西和阿根廷等新晋大豆生产国也发生了该病害,全世界累计损失已经达到 150 多亿美元^[2], 因此大豆胞囊线虫病的防治具有十分重要的意义。

目前国际上防治大豆胞囊线虫病害最经济有效的方法是抗病育种,而抗原材料多数来自于我国的小黑豆。早在 1958 年 Ross 等^[3]发现大豆胞囊线

虫侵染后在抗病品种 Peking 不形成合胞体而在寄主取食位点的细胞附近形成坏死反应,吴海燕等^[4]的研究也证实了这一点,但对于其它小黑豆品种被大豆胞囊线虫的侵入后组织病理学反应研究很少,不同抗性小黑豆品种抗大豆胞囊线虫侵染的组织病理学变化可以解释寄主的不同抗线虫机制,线虫侵染后的组织病理学变化对于有效利用不同抗性机制的小黑豆品种培育抗线虫大豆品种具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

感病品种:辽豆 15;抗线虫品种:灰皮支黑豆、哈尔滨黑豆、小粒黑豆,均由沈阳农业大学北方线

收稿日期:2016-02-20
基金项目:公益性行业专项(201503114-12);国家自然科学基金重点项目(31330063);国家自然科学基金面上项目(31171569);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-PS13)。
第一作者简介:刘鹤(1990-),女,硕士,主要从事植物线虫病害研究。E-mail:745141200@qq.com。
通讯作者:段玉玺(1964-),男,教授,主要从事大豆胞囊线虫研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

虫研究所保存。

供试线虫:大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*) 3 号生理小种。胞囊土采自沈阳农业大学胞囊线虫繁殖圃。

1.2 方法

1.2.1 胞囊及二龄幼虫(J2)的制备 采用淘洗过筛法,从土样中分离大小饱满均一的胞囊。在 0.5% NaClO 溶液中浸泡 3 min 表面消毒,用无菌水冲洗数次获得新鲜的胞囊。将挑取的胞囊浸泡在 3 mmol·L⁻¹ ZnSO₄溶液中,在 24℃ 的温箱中,4 d 后收集大豆胞囊线虫二龄幼虫,用无菌水将线虫的密度调整为 1 000 条·mL⁻¹。

1.2.2 大豆幼根的准备 自来水冲洗大豆种子 15 min,放入 70% 乙醇中处理 50 s,无菌水冲洗 4 次后,放入 5% NaClO 溶液中处理 15 min,然后再用无菌水冲洗 5 次,放入灭过菌的培养皿中于 24℃ 的温箱中进行催芽,当根系长出 2 cm 时取出,用无菌水冲洗数次备用。

1.2.3 大豆胞囊线虫的接种 将灭好菌的 1 kg 沙土混合物(体积比 1:1)装入黑色塑料钵(16 cm × 16 cm)中,移栽前一天浇透水,移栽时每钵中间用铅笔插 1 个 3 cm 深的小孔,将催好芽健壮的大豆幼苗放入孔内,每盆接种 1 mL 二龄幼虫悬液,覆土后在温室内培养。每个处理 3 次重复。

1.2.4 大豆根内线虫的染色及胞囊量的计数 将接种后 2,3,5 和 25 d 的大豆从沙土中取出,一部分用于石蜡切片的取样,另一部分参照刘维志^[5]的方法对大豆幼根进行次氯酸钠-酸性品红染色,并在显微镜下拍照。将接种后 30 d 的大豆根系从土中取出在显微镜下进行胞囊的计数。

1.2.5 不同品种大豆根系石蜡切片的制作 将取好样的大豆主根切成 1 cm 左右小段,放入 50% 酒精配制的 FAA 固定液中固定 24 h 以上,再转入 70% 酒精配置的 FAA 固定液中固定 24 h 以上。参照毛晓霞^[6]和王宝荣等^[7]的方法经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色、封片等步骤对不同品种大豆根系进行组织切片。并用 OLYMPUS BX53 生物显微镜进行观察,并拍照记录不同品种大豆的组织学变化情况。

1.3 数据分析

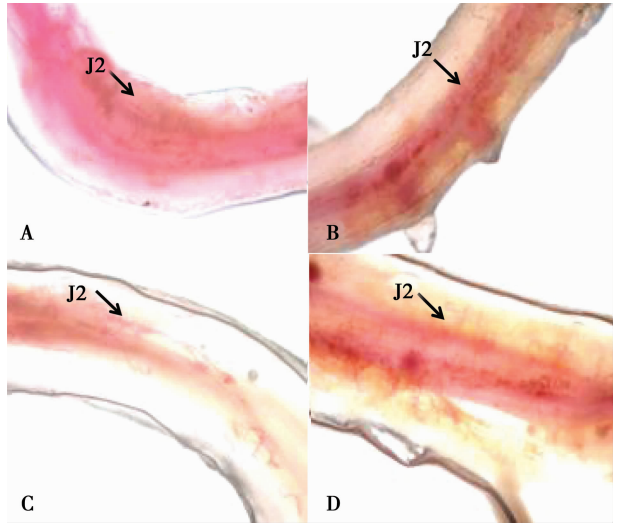
应用 OLYMPUS BX53 生物显微镜的 Cellsens standars 1.11 对大豆根组织进行测量与分析,应用 SPSS 17.0 和 Excel 2007 进行统计。

2 结果与分析

2.1 SCN 的侵染和胞囊的形成

抗病品种大豆的根系和感病品种辽豆 15 经过

酸性品红染色(图 1 和表 1),在侵染初期的第 2 天,所有品种大豆都有大量的胞囊线虫二龄幼虫的侵入,并且抗感品种的侵染数量相似,说明抗感品种都不具有抗侵入作用。在接种后 3~5 d 抗感品种根内二龄幼虫的数量和第 2 天相似更加证明了这一点。接种后 25 d,3 个抗病品种小黑豆根内二龄幼虫的数量明显低于感病品种辽豆 15 根内二龄幼虫的数量,其中灰皮支黑豆的二龄幼虫数量最少。接种二龄幼虫 30 d 后抗病品种根表几乎不形成胞囊,而辽豆 15 根表则产生大量胞囊(图 2),这表明这 3 个小黑豆品种对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的抗性为抗发育。



A: 辽豆 15; B: 灰皮支黑豆; C: 哈尔滨小黑豆; D: 小粒黑豆; J₂: 二龄幼虫; 下同。
A: Liaodou1 15; B: Huipizhi Heidou; C: Harbin Xiaoheidou; D: Xiaoli Heidou; the same below.

图 1 不同品种大豆接种 J₂ 后 48 h 根内胞囊线虫侵入情况

Fig. 1 The J₂ invasion in roots after inoculated with J₂ for 48 h among different soybean cultivars



图 2 辽豆 15 接种大豆胞囊线虫 3 号小种后 30 d 根表形成的胞囊

Fig. 2 The cysts on Liaodou 15 soybean roots after inoculated with J₂ for 30 d

表 1 不同品种大豆根内 J2 和胞根表囊数量

Table 1 Numbers of J2 inside roots and cysts outside the roots among different soybean cultivars

品种 Cultivar	接种后 2 天 J2 数量 Numbers of J2 2 DAI	接种后 3 天 J2 数量 Numbers of J2 3 DAI	接种后 5 天 J2 数量 Numbers of J2 5 DAI	接种后 25 天 J2 数量 Numbers of J2 25 DAI	接种后 30 天胞囊数量 Numbers of cysts 30 DAI
辽豆 15 Liaodou 15	153 a	147 a	144 ab	72 a	102.0 a
灰皮支黑豆 Huibuzhi Heidou	155 a	150 a	155 a	24 c	0 c
哈尔滨小黑豆 Harbin Xiaoheidou	138 a	135 b	135 b	38 b	3.6 b
小粒黑豆 Xiaoli Heidou	113 b	111 c	104 c	36 b	19.8 b

DAI 代表接种后天数的缩写,同列的不同小写字母代表 J2 或胞囊数量在 0.05 水平上差异显著。下同。

DAI represented day after inoculated. Values in the same column followed by different letters are significantly different at 0.05 probability level. The same below.

2.2 SCN 侵染后不同品种大豆根系组织结构分析

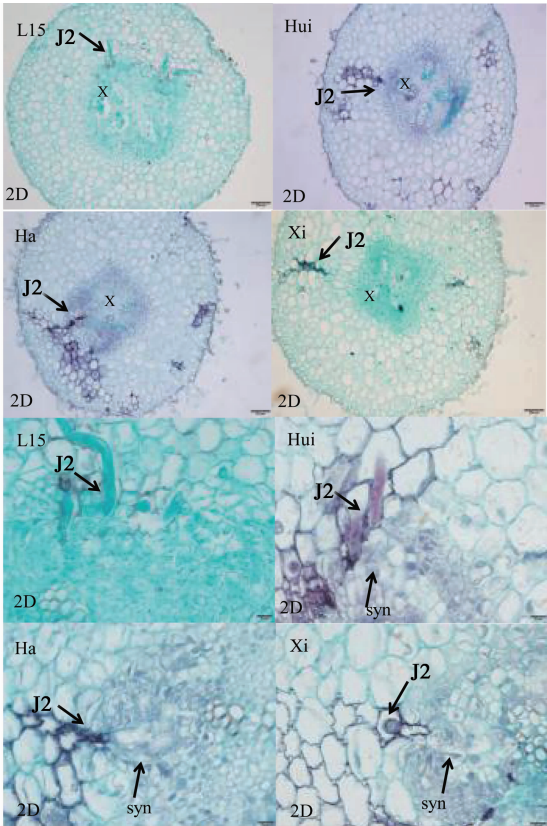
从图 3 可以看出,大豆根系在接种 SCN J2 后 48 h 就有大量的线虫侵染,侵入根表后,寄主大豆组织就产生了比较强烈的反应,在抗病品种中表现更明显,由于线虫的侵入,造成根系的很多微创伤,主要发生在大豆的皮层。感病品种辽豆 15 受侵染后,多数线虫快速侵入到中柱鞘附近,抗病品种中只有哈尔滨小黑豆有部分线虫侵染到中柱鞘,此时抗病品种都产生了合胞体(syncytium)。

从图 4 可以看出,接种后 3 d 寄主和线虫的互作更为激烈,哈尔滨小黑豆和小粒黑豆以及灰皮支黑豆都产生明显的组织坏死,感病品种辽豆 15 的根系没有发生激烈的抵抗反应。在感病品种的线虫侵染部位也产生了细胞的形变,细胞拉长,形成了合胞体,通常合胞体细胞围绕线虫头部附近排列。

接种后 5 d,可以观察到抗病品种出现了大量的过敏性坏死反应。灰皮支黑豆和小粒黑豆根内的过敏性坏死反应由线虫头部蔓延至合胞体,使合胞体的细胞发生坏死,哈尔滨小黑豆中柱内形成的合胞体由中心向四周发生坏死,感病品种辽豆 15 合胞体周围没有发生过敏性坏死反应,合胞体继续发育(图 5)。

接种后第 25 天,可以看出线虫在不同抗性品种根内的发育情况不同。灰皮支黑豆根内大部分线虫周围细胞发黑坏死停留在二龄至三龄阶段,小粒黑豆和哈尔滨小黑豆根内多为三龄,其中哈尔滨小黑豆根内有少量线虫可以发育成四龄。感病品种辽豆 15 根内多为四龄虫态的线虫。抗感品种的组织发育也存在着差异,经过了一系列的抗性反应,在抗性品种中被破坏的皮层细胞恢复正常,坏死的合胞体颜色变黑,附近细胞发生了明显的木质化现象。感病品种辽豆 15 的合胞体正常发育,占据了

中柱组织,与对照相比次生木质部发生了严重的外移,导管密度明显小于对照和抗病品种小黑豆的导管密度并且导管多以大孔径为主(图 6)。



D: 接种后的天数; L15: 辽豆 15; Hui: 灰皮支黑豆 Ha: 哈尔滨小黑豆; Xi: 小粒黑豆; X: 木质部; syn: 合胞体; 对照: 没有接种线虫的根段, 下同。

D: Days after inoculated; L15: Liaodou 15; Hui: Huipizhi Heidou; Ha: Haerbin Xiaoheidou; Xi: Xiaoli Heidou; X: Xylem; syn: syncytium; Control: the root without J2, the same below.

图 3 接种 J2 2 d 后不同品种大豆根系的石蜡切片

Fig. 3 The root paraffin of different soybean cultivars roots 2 days after inoculated with J₂

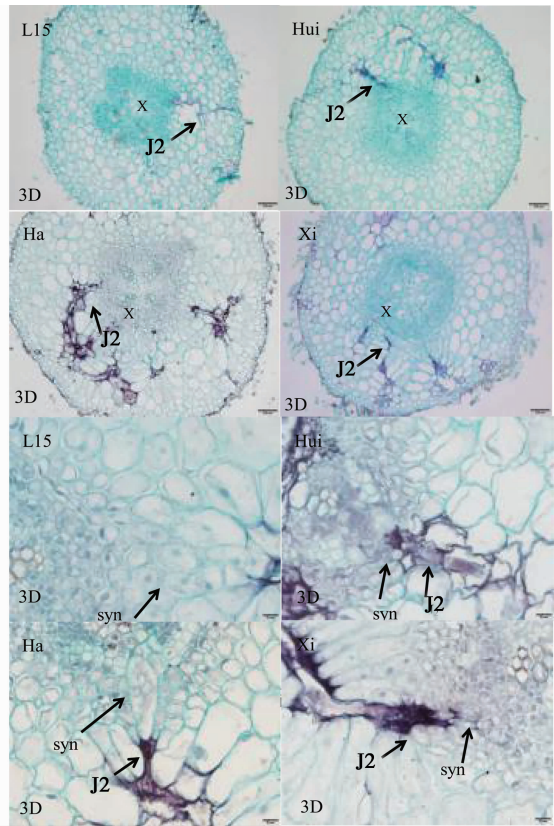


图4 接种J₂ 3 d后不同品种大豆根系的石蜡切片
Fig. 4 The root paraffin of different soybean cultivars roots 3 days after inoculated with J₂

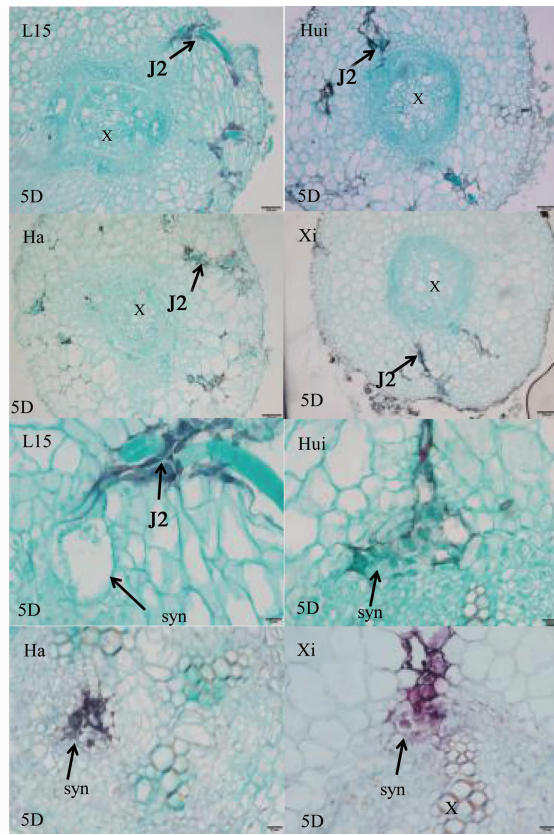


图5 接种J₂ 5 d后不同品种大豆根系的石蜡切片
Fig. 5 The root paraffin of different soybean cultivars roots 5 days after inoculated with J₂

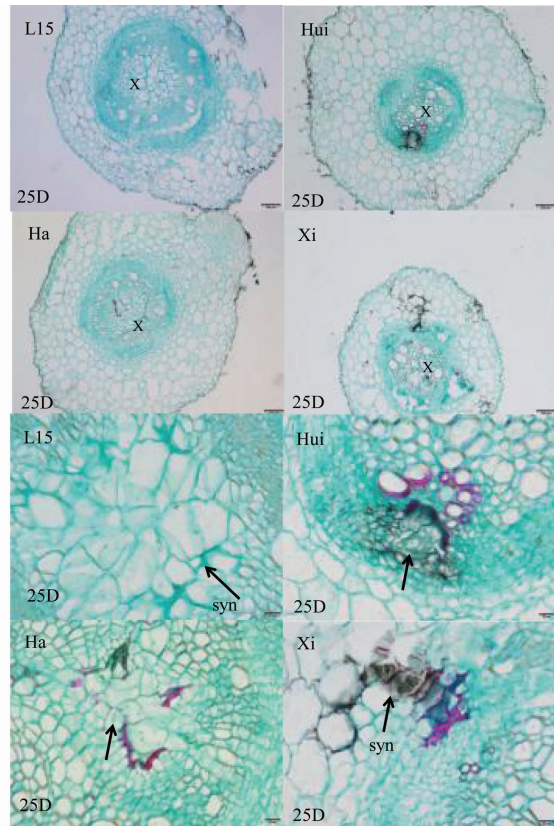


图6 接种J₂ 25 d后不同品种大豆根系石蜡切片
Fig. 6 The root paraffin of different soybean cultivars roots 25 days after inoculated with J₂

3 结论与讨论

大豆胞囊线虫从寄主的根部侵入定殖,形成合胞体,给寄主的根系造成伤害,抗感品种大豆在根内会形成不同的抗性反应来抵抗线虫的侵染。本试验研究表明:侵染初期不同品种大豆根内的二龄幼虫侵染数量相似,说明3个抗病品种大豆几乎都不抗侵入。随着线虫在大豆根内的侵染,抗感品种大豆都可以在维管束鞘细胞附近形成合胞体,抗病品种根内形成合胞体的时间要略早于感病品种,然后很快发生过敏性坏死反应,使合胞体不能发育。其中哈尔滨小黑豆和感病的辽豆15都可以在中柱内形成合胞体,说明哈尔滨小黑豆的抗侵入能力较弱。相似的结果在一些研究中有所体现,如Aditya等^[8]的研究发现在禾谷胞囊线虫侵染的初期抗性品种Chebec根内的合胞发展进程要快于感病品种Skiff。Endo^[9]在1965和1970年发现Peking在人工接种2~3 d时,也能形成合胞体,但5 d后合胞体退化,并逐渐坏死,表现了过敏性坏死反应。刘大伟等^[10]研究表明接种了10 d后抗病品种灰皮支黑豆根部形成的合胞体较小,多发生在鞘细胞处而感病品种辽豆15根部木质部导管附近形成较大的合胞体。在这些试验中抗性品种根内合胞体的变化迅速,因此Ross在1958年抗性品种的研究中没

有观察到合胞体的形成可能是由于选取材料的取样时间不同,根内观察到的组织学变化也会有所差异,此外大豆胞囊线虫在大豆根内定殖由于温度、水势等环境条件的不同二龄幼虫的侵染速度也会不同从而影响了合胞体的形成。在接种后 25 d 感病品种辽豆 15 根内有大量的雌虫形成,哈尔滨小黑豆和小粒黑豆根内形成的雌虫数量很少,灰皮支黑豆根内几乎没有雌虫的形成,说明 3 个抗性品的小黑豆都不利于雌虫的发育,其中灰皮支黑豆具有很强的抗发育作用,这也是 3 个小黑豆品种的抗性机制。

胞囊线虫的侵入也会造成感病品种辽豆 15 维管束结构的改变。接种后 25 d,与对照相比感病品种辽豆 15 在中柱内发育的合胞体使次生木质部位置外移,导管密度减少,多以大孔径导管为主,抗病品种的木质部结构和对照相比类似,木质部位置没有发生外移。一些研究表明大管径导管脆弱,易引起空穴与栓塞,单位面积上导管数量多,即使部分导管形成气体栓塞,对整体输导系统也不会产生重要影响,可保证水分运输的安全性^[11]。本试验结果表明接种胞囊线虫后抗性品种大豆的水分运输安全性更高,更有利于大豆自身的生长。随着不同品种小黑豆根系组织学的比较,大豆根系结构与抗性的关系将为植物抗病机制与育种研究开辟新途径。

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, 2000:281-294. (Liu W Z. Plant pathogenic nematodes [M]. China Agriculture Press,2000:281-294.)

[2] Wrather J A, Koenning S R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005 [J]. Journal of

Nematology, 2006, 38(2): 173.

[3] Ross J P. Host-parasite relationship of the soybean cyst nematode in resistant soybean roots[J]. Phytopathology, 1958, 48(10): 578-579.

[4] 吴海燕,远方,陈立杰,等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. 大豆科学,2001,30(4):285-289. (Wu H Y,Yuan F, Chen L J,et al. Advance in soybean cyst nematodes and mechanism of soybean resistance to *Heterodera glycines* [J]. Soybean Science,2001,20(4):285-289.)

[5] 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 W. Plant nematode and technology studies [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press,1995.)

[6] 毛晓霞. 石蜡切片制作方法的改良[J]. 安徽农学通报,2013(8):15-16,39. (Mao X X. The improved methods of paraffin sections production [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2013(8):15-16,39.)

[7] 王宝荣,金延明. 植物切片混合染液染色方法[J]. 中国中药杂志,1995,20(4):20(Wang B R, Jin Y M. Slice mixing plant dye staining method [J]. Traditional Chinese Medicine, 1995, 20(4):20.)

[8] Aditya J, Lewis J, Shirley N J, et al. The dynamics of cereal cyst nematode infection differ between susceptible and resistant barley cultivars and lead to changes in (1, 3; 1, 4)- β -glucan levels and *HvCslF* gene transcript abundance [J]. New Phytologist, 2015, 207: 135-147.

[9] Endo B Y. Feeding plug formation in soybean roots infected with the soybean cyst nematode[J]. Phytopathology, 1978, 68: 1022-1031.

[10] 刘大伟,陈立杰,段玉玺. 灰皮支黑豆对大豆胞囊线虫 3 号生理小种侵染和发育的影响[J]. 作物杂志,2014(1):145-147. (Liu D W, Chen L J, Duan Y X. Huipizhiheidou on the penetration and development of race 3 of *Heterodera glycines*[J]. Corps, 2014(1):145-147.)

[11] 陈树思. 洋蒲桃次生木质部中导管分子的解剖学[J]. 植物学通报,2006(6):677-683. (Chen S S. Anatomy of vessel elements in the secondary xylemof syzygium samarangense [J]. Chinese Bulletin of Botany,2006(6):677-683.)

欢迎订阅《辽宁农业科学》

《辽宁农业科学》是辽宁省农业科学院与辽宁省农学会共同主办的综合性农业科技期刊,面向国内外公开发行。主要报道农业科研进展和成果,宣传农业新品种、新技术、新方法,传播新的学术思想、观点和科技知识。

刊号:ISSN 1002 - 1728 CN 21 - 11111/S
邮发代号:8 - 21 双月刊 双月 18 日出版
单价:6.00 元 全年:36.00 元

全国各地邮局均可订阅。

地址: 沈阳市东陵路 84 号《辽宁农业科学》编辑部 邮编: 110161
电话: 024 - 31029927 E - mail:Lnny@ Chinajournal. net. cn