

大豆抗腐霉根腐病的生理差异研究

魏 峡^{1,2,3}, 王伟威^{1,2,3}, 李馨园^{2,4}, 喻德跃³, 刘丽君^{1,2}

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 国家农作物改良中心哈尔滨分中心, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 南京农业大学 农学院, 江苏 南京 210095; 4. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:腐霉根腐病是大豆主要的土传病害,为揭示抗感病大豆品种的生理差异,对不同抗性品种在腐霉病原菌感染下的大豆下胚轴中丙二醛、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、可溶性糖、脯氨酸含量的变化进行测定。结果表明:腐霉菌侵染后,抗病大豆品种下胚轴的丙二醛含量增加不十分明显;可溶性糖含量都是正向增加,苯丙氨酸解氨酶活性,过氧化物酶活性,脯氨酸含量在不同时段都有所增加且抗病品种明显高于感病品种。而感病品种在腐霉菌侵染条件下,大豆下胚轴中丙二醛含量累积较高,可溶性糖在某一时段内有所减少,苯丙氨酸解氨酶活性、过氧化物酶活性,脯氨酸含量增加幅度小于抗病品种,表明抗病品种具有较强的生理生化调节能力。
关键词:腐霉根腐病;大豆;生理
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0425

Physiological Differences in Soybean Resistance to *Pythium* Root Rot

WEI Lai^{1,2,3}, WANG Wei-wei^{1,2,3}, LI Xin-yuan^{2,4}, YU De-yue³, LIU Li-jun^{1,2}

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. National Harbin Center for Soybean Improvement, Harbin 150086, China; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: *Pythium* root rot is an important soil-born diseases, revealing the physiological differences of susceptible variety has important significance in resistant varieties breeding. Using physiological techniques to detected MDA, solutions of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD), the change of soluble sugar and proline content in different resistance cultivars under *Pythium* infection in soybean hypocotyls. Research results showed that after *Pythium* infection, in resistant cultivars' hypocotyl and malondialdehyde content were not increased obviously in resistant cultivar, and soluble sugar contents were increased. Solution of phenylalanine ammonialyase activity, peroxidase activity, proline contents increased in different phase and significantly higher than these in the susceptible varieties. Susceptible variety after *Pythium ultimum* infested conditions, malondialdehyde content were high and soluble sugars would reduce in a given period. Solution of phenylalanine ammonialyase activity, peroxidase activity, and proline content were increased, but less than that in resistant varieties, indicated that resistant varieties had strong physiological and biochemical regulation.
Keywords: *Pythium* Root Rot; Soybean; Physiological differences

大豆腐霉根腐病是由腐霉菌(*Pythium*)引起的全世界范围的主要病害之一,可导致大豆出土前烂种、烂芽,出土后幼苗猝倒、枯死,致使大豆产量大幅度下降,严重时产量损失达40%以上。多年来,黑龙江省大豆根腐病发病较重,李宝英和马淑梅^[1]对来自三江平原及中西部地区的320份根腐病标样进行分离得到4种重要致病菌:尖孢镰孢菌(*F. oxysporom*)、腐霉菌(*Pythium*)、疫霉菌(*Phytophthora sojae*)和立枯丝核菌(*R. solani*)。黑龙江省大豆腐霉根腐病的主要病原菌是*Pythium ultimum*(*P. ultimum*)。该致病菌的出现频率与疫霉根腐病相同为25.2%,局部地区高于疫霉根腐病发病率^[2]。*P.*

*ultimum*在温度较低时致病能力提高^[3-4],在15~20℃时对大豆致病性最高^[5-6]。腐霉根腐病在黑龙江省北部和中部地区出现频率较高,分别为25.6%和32.6%^[2]。揭示抗病品种的生理基础,对资源挖掘、拓宽抗性基因资源库,缩短抗腐霉根腐病的育种进程有着重要的理论和现实意义,而关于大豆抗腐霉根腐病生理基础的研究还鲜有报道。为此,本研究利用课题组筛选的抗感大豆品种^[7],研究腐霉菌侵染条件下,大豆下胚轴中丙二醛、可溶性糖、苯丙氨酸解氨酶(phenylanine ammonia-lyase, PAL)活性,过氧化物酶活性,脯氨酸含量的意义,为揭示大豆抗腐霉根腐病的生理生化机制奠定理论基础。

收稿日期:2016-11-29
基金项目:国家现代农业产业技术体系(CARS-04-PS05);黑龙江省农业科学院创新基金(2014ZD011);国家转基因重大专项(2016ZX08004-002)。
第一作者简介:魏峡(1985-),女,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:adalwei@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 菌种 腐霉菌小种 *Pythium ultimum*。
- 1.1.2 大豆品种 高抗腐霉菌大豆品种:灰皮支黑豆;抗腐霉菌大豆品种:黑农 55、嫩丰 16、嫩丰 19;感腐霉菌大豆品种:抗线 3 号、东农 47、抗线 5 号,均来自黑龙江省农业科学院大豆研究所。

1.2 方法

- 1.2.1 培养基的制备 WA 固体培养基:10 g 琼脂粉,加蒸馏水混匀,定容至 500 mL,置于灭菌锅中 121℃ 高压灭菌 15 min,将灭好菌的培养基在无菌条件下,倒入环氧乙烷灭菌的一次性平皿中,每个平皿约含 20 mL 培养基,冷却凝固后用无菌袋密封,置于无菌培养箱中备用。
- V8 固体培养基:140 mL V8 过滤液(2 层纱布过滤)、0.6 g 碳酸钙,加蒸馏水溶解后,加 20 g 琼脂粉混匀,定容至 1 L,置于灭菌锅中 121℃ 高压灭菌 15 min,将灭好菌的培养基在无菌条件下,倒入环氧乙烷灭菌的一次性平皿中,每个平皿约含 20 mL 培养基,冷却凝固后用无菌袋密封,置于无菌培养箱中备用。
- 1.2.2 腐霉菌的培养 避免冰箱内的腐霉菌小种活性降低,先对其进行扩繁,用灭菌的打孔器,在培养腐霉菌的 V8 培养基距平皿边缘 2 mm 处打孔,用接种针将打好的小圆片倒放在一个包含 20 mL V8 培养基的平皿中心,放置于生化培养箱中 25℃ 暗室培养。3 d 后,用灭菌的打孔器按上述方法在新长满腐霉菌的 V8 培养基上打孔,用接种针将打好的小圆片倒放在一个包含 20 mL WA 培养基的平皿中心,放置于生化培养箱中 25℃ 暗室培养。
- 1.2.3 大豆的腐霉菌接种 将大豆用清水洗净,晾干,用氯气表面灭菌 12 h,然后用无菌蒸馏水浸泡,泡好后再在无菌条件下,将 10 粒大豆种子均匀摆放在

装有 WA 培养基的平皿上,距离平皿边缘 2 mm 左右,放于生化培养箱中 20℃ 暗室培养 2~3 d。

待接菌的 WA 培养基培养 3 d 后,平皿中长满腐霉菌菌丝,在无菌条件下,分别选取 6 粒下胚轴长至 2 cm 左右长势基本一致的大豆种子均匀的摆放在接菌和未接菌的含有 WA 培养基的平皿上,下胚轴指向平皿中心,每个品种 28 盘。然后将平皿置于生长箱中 20℃,暗室培养。并于 0,12,24,36,48,60 和 72 h 进行观测和取样,以未接菌的为对照。取样时,沿子叶与下胚轴结合处将下胚轴切下,快速放于液氮中速冻,保存在 -80℃ 冰箱内备用,每个品种每次取 4 盘。

1.2.4 生理指标测定 丙二醛和可溶性糖含量采用 TBA 显色法^[8],苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性参照郝再林的测定方法^[8],过氧化物酶(POD)活性参照张志良的测定的方法^[9],脯氨酸含量的测定采用酸性茚三酮显色法^[9]。

1.4 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据的统计分析。

2 结果与分析

2.1 腐霉菌对大豆下胚轴中丙二醛含量的影响

丙二醛(MDA)是膜脂氧化的最终产物,丙二醛的大量积累对能引发细胞膜功能紊乱,使多功能分子和膜系统的生理功能的完整性被破坏。由图 1a 可以看出,感病大豆品种在接种腐霉菌 *P. ultimum* 后下胚轴中丙二醛含量增加变化在品种间存在差异,东农 47 和抗线 3 号在接种后 36 h 积累量最高,丙二醛含量比自身 CK 增加 59.1%、44.25%,而抗线 5 号则在 48 h 时下胚轴丙二醛含量达到了一个高峰值,在 72 h 积累量达最高,与自身 CK 相比,下胚轴中丙二醛含量增加了 48.0%,表明了感病品种间抵抗病原菌的差异与丙二醛含量的变化有关。

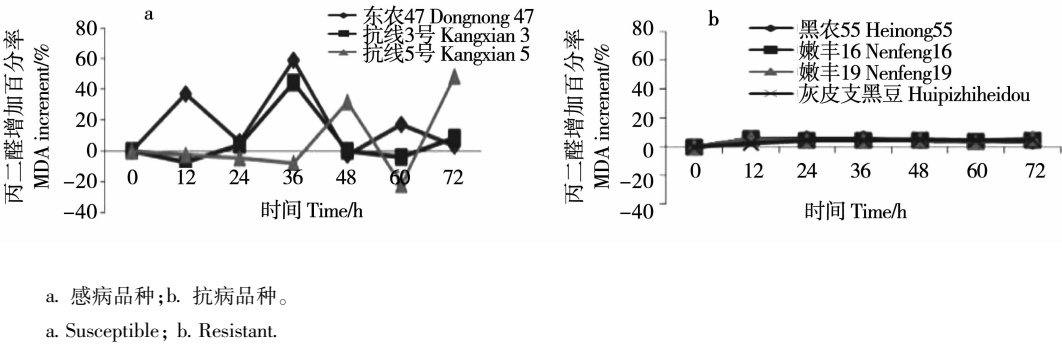


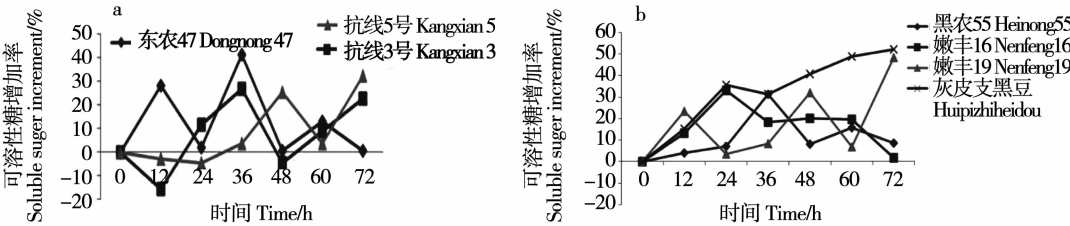
图 1 腐霉菌侵染抗、感病大豆品种下胚轴丙二醛含量变化
Fig. 1 The change of MDA contents in hypocotyls of infected soybean

由图 1b 可以看出,抗病大豆品种在接种腐霉菌 *P. ultimum* 后,丙二醛含量较对照组变化不十分明显。下胚轴中丙二醛含量的增加率与每一时间段 CK 相比,黑农 55 在侵染 48 h 积累量最高,嫩丰 16 在 24 h 积累量最高,嫩丰 19 在 24 和 48 h 积累量最高。综合分析,4 个抗病品种黑农 55、嫩丰 16、嫩丰 19、灰皮支黑豆在腐霉菌侵染下胚轴后的 24 和 48 h 丙二醛含量有所增幅,最大值为 14.44%、18.51%,但与感病品种相比,可以看出:感病大豆品种在腐霉菌侵染后的丙二醛含量增加率的变化幅度明显大于抗病大豆品种的变化幅度。

2.2 腐霉菌 (*P. u*) 对大豆下胚轴中可溶性糖含量的影响

糖是细胞膜的有效保护剂,在病原菌等胁迫条件下,高分子化合物的合成和降解可以有效调节植

物的渗透增强抗逆性。由图 2 可以看出,感病大豆品种在接种腐霉菌后,下胚轴中可溶性糖含量的增加量呈波浪式规律性变化,东农 47 在侵染后的 12, 36 和 60 h 出现积累峰值,其可溶性糖含量增幅分别为 28.01%、41.19% 和 32.10%,抗线 3 号在 36 和 72 h 出现积累峰值,抗线 5 号在 48 和 72 h 出现积累峰值。抗病大豆品种与自身 CK 相比,可溶性糖含量增加率有正向的也有负向的,表明 *P. u* 侵染后,在某些细胞内的糖分减少。而抗病大豆品种可溶性糖的增加率都是正向的,在每一个时段的糖分都有增加。



a. 感病品种; b. 抗病品种。
a. Susceptible; b. Resistant.

图 2 腐霉菌侵染大豆品种下胚轴可溶性糖增加百分率

Fig. 2 The increased percentage of the soluble sugar contents in hypocotyls of infected soybean

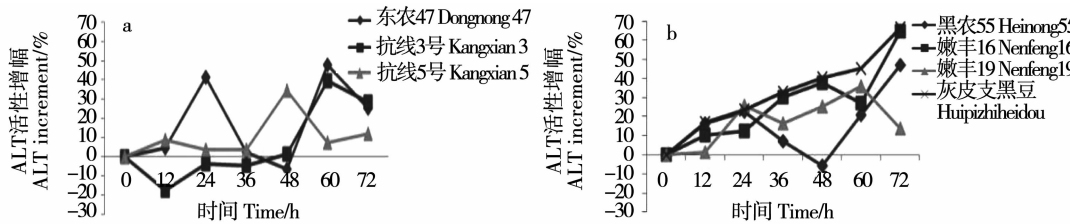
2.3 腐霉菌对大豆下胚轴中苯丙氨酸解氨酶活性的影响

苯丙氨酸解氨酶是苯丙氨酸代谢途径的关键酶和限速酶。由图 3 可以看出;感病大豆品种下胚轴中苯丙氨酸解氨酶活性增幅与每一时段自身对照相比,东农 47 在 24 和 60 h 酶活性明显增强,下胚轴中苯丙氨酸解氨酶活性的增幅为 41.19% 和 47.87%。品种间存在差异,如抗线 3 号在 60 h 时苯丙氨酸解氨酶活性增加到最高。

而抗病大豆品种在接种后,下胚轴中苯丙氨酸

解氨酶活性的增幅与每一时段自身对照相比,抗病品种在不同时段出现峰值,但品种间有差异,抗病品种下胚轴中苯丙氨酸解氨酶活性在 24,48 和 72 h 的增幅最大值为 25.78%、37.66%、64.6%。

由图 3 可以看出,由不同抗病类型大豆品种在侵染的下胚轴中苯丙氨酸解氨酶活性的增幅变化规律可以看出,不同类型大豆品种苯丙氨酸解氨酶的活性均呈增加趋势,感病品种酶活性的增幅小于抗病类型品种。说明感病大豆品种在接种腐霉菌后下胚轴中苯丙氨酸解氨酶的活性小于抗病品种。



a. 感病品种; b. 抗病品种。
a. Susceptible; b. Resistant.

图 3 腐霉菌侵染大豆品种下胚轴苯丙氨酸解氨酶活性增幅

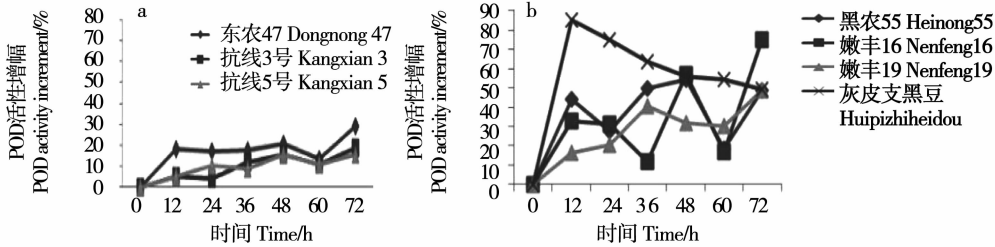
Fig. 3 The increased percentage of the ALT activities in hypocotyls of infected soybean

2.4 腐霉菌对大豆下胚轴中过氧化物酶活性的影响

由图4可知,感病品种东农47、抗线3号、抗线5号在12、48和72 h出现峰值,东农47最高增幅分别达到18.5%、21.03%、29.35%。而抗病品种在侵染后,下胚轴中过氧化物酶活性的增幅与每一时段自身CK相比,抗病品种黑农55、嫩丰16、嫩丰19在12、48和72 h出现峰值,其各时段最大增幅达到48.69% (黑农55)、57.29% (嫩丰16)、75.22% (嫩

丰16)。而高抗腐霉大豆品种灰皮支黑豆的下胚轴过氧化物酶活性在腐霉菌侵染12 h时就大量积累,超过所有品种。同时在被侵染60 h后,个体保持较强的过氧化物酶活性。

可以看出,不同抗病类型品种在腐霉菌侵染后,下胚轴中的过氧化物酶活性增加,而感病品种的增幅远小于抗病品种,增幅的变化幅度也小于抗病大豆品种,由此说明病原菌侵染条件下,感病品种过氧化物酶的活性低,抵抗病原菌的能力弱。



a. 感病品种;b. 抗病品种。
a. Susceptible; b. Resistant.

图4 腐霉菌侵染抗、感病大豆品种下胚轴过氧化物酶活性增幅百分率

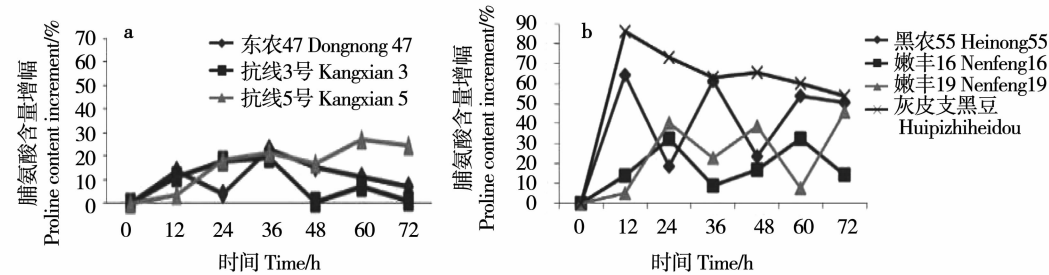
Fig. 4 The increased percentage of the POD activities in hypocotyls of infected soybean

2.5 腐霉菌对大豆下胚轴脯氨酸含量的影响

通过侵染条件下大豆下胚轴中的脯氨酸含量测定分析发现:在侵染条件下,感病品种下胚轴中的脯氨酸含量的增加幅度比较平稳,在12、36和60 h出现峰值,其最大增幅达到13.77% (东农47)、23.09% (东农47)和26.91% (抗线5号)(图5)。

而抗病品种在接种后,下胚轴中脯氨酸含量增加率在每一时段与自身对照相比,抗病品种黑农55

在病原菌侵染后的12、36和60 h出现峰值,其下胚轴中脯氨酸含量的增加率最大值为64.3%、61.23%、53.78%,而嫩丰16、嫩丰19则在24和48 h出现峰值,其下胚轴中脯氨酸含量的增加率最大值为40.56% (嫩丰19)、38.6% (嫩丰19),高抗腐霉病大豆品种灰皮支黑豆则在病原菌侵染12 h脯氨酸的积累达到高峰,为所有品种积累脯氨酸含量最高的品种。



a. 感病品种;b. 抗病品种。
a. Susceptible; b. Resistant.

图5 腐霉菌侵染抗、感病大豆品种下胚轴脯氨酸含量增加百分率

Fig. 5 The increased percentage of the proline contents in hypocotyls of infected soybean

综合抗感不同大豆品种在侵染后下胚轴脯氨酸含量增加率的变化规律可以看出,不同抗性的大豆品种下胚轴脯氨酸含量与自身对照相比,脯氨酸含量都有所增加,而感病大豆品种的增幅远小于抗病大豆品种。

3 结论与讨论

3.1 抗病大豆品种的生理特点

分析腐霉菌侵染下不同抗病类型大豆品种下胚轴各项生理指标的变化可以看出,抗病大豆品种下胚轴中丙二醛含量积累较少,可溶性糖含量增

加,苯丙氨酸解氨酶活性,过氧化物酶活性,脯氨酸含量增加量高于感病品种;而感病品种在腐霉侵染条件下,下胚轴中丙二酸含量积累较高,在侵染 36 h 比自身 CK 增加量达 59.10% (东农 47)。可溶性糖含量在初始时间段内有所减少,在病原菌侵染后,感病品种可溶性糖增加的量也小于抗病品种,苯丙氨酸解氨酶活性,过氧化物酶活性,脯氨酸含量的增加量都小于抗病品种,文中各项生理指标的变化是用增加(或降低)的百分率表示的。在某些时间段生化性状变化与自身 CK 相比差别不是很大,它反映植物的代谢过程的变化,首先要适应逆境、增强抗氧化、抗胁迫的物质,消耗后再积累;在 48 h 后大豆可溶性糖、苯丙氨酸解氨酶活性、过氧化物酶活性、脯氨酸含量增加明显的品种,其植株自身调解抗病能力增强,阻碍病原菌的侵染,其品种对腐霉病原菌具有一定的抗性。

3.2 可溶性糖与大豆抗腐霉根腐病呈正相关

腐霉侵染下,大豆下胚轴中的可溶性糖含量与品种的抗病性相关。糖类是作物生长发育的重要成分,是植物碳骨架和能量的来源,属基本代谢^[10]。腐霉侵染下,根细胞中可溶性糖增高表明可溶性糖的渗透作用能参与细胞的渗透调解。糖作为重要的信息物质调控大豆根部细胞对病原菌侵染下的环境适应性,品种在病原菌侵染后的某一时段增加量有所降低,它反映了大豆品种在适应病原菌过程中代谢紊乱已超出了自身渗透调解范围而产生伤害。高抗腐霉病的大豆品种,在腐霉菌侵染条件下,下胚轴中可溶性糖的含量比较高,渗透调节能力强。

3.3 苯丙氨酸解氨酶与大豆抗腐霉根腐病相关

苯丙氨酸解氨酶是植物次生代谢途径中苯丙氨酸代谢途径的关键酶和限速酶^[11],它主要催化 L-苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸,为多种酚类及类黄酮终端产物提供前体物质,这些物质在植物生长发育、抗病、抗逆反应中起着重要作用,也被称为是植物防御酶。本研究也证实抗病品种在腐霉菌侵染下,大豆下胚轴中苯丙氨酸解氨酶活性增加幅度高于感病品种,表明抗病品种苯丙氨酸解氨酶基因的表达量较高、活性较强,但品种间存在差异,个别品种在侵染过程中苯丙氨酸解氨酶活性呈 M 形变化,表明品种受病原菌侵染后次生代谢物质不足形成代谢紊乱,不断调整,平衡前体物质,使之适应和抵抗病原菌侵入。同时也反映了苯丙氨酸解氨酶基因在大豆中的时空表达特性。从本研究看到,病原菌侵染 60 h 后,苯丙氨酸解氨酶活性仍不断增强的品种,抗病性是很好的,在腐霉病原菌胁迫下表现较高活性的防御反应。

本研究表明,大豆受腐霉菌侵染后,抗感品种幼根内的可溶性糖、PAL、POD、脯氨酸含量均表现升高,并且高抗品种灰皮支黑豆各生理生化指标的高峰值出现的早,体内防御系统较强,在抵抗病原菌侵染过程中发挥重要作用。

参考文献

[1] 李宝英,马淑梅. 大豆根腐病原菌的种类及抗原筛选[J]. 植物保护学报, 2000, 27(1): 91-92. (Li B Y, Ma S M. Pathogens of soybean root rot and screening of resistant sources[J]. Journal of Plant Protection, 2000, 27(1): 91-92.)

[2] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病主要病原菌种类分布及抗病种质鉴定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 230-235. (Ma S M. Pathogenic pathogen categories distribution and germplasm resistance identification of soybean root rot in Heilongjiang province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 230-235.)

[3] Thomson T B, Athow K L, Laviolette F A. The effect of temperature on the pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, and *P. ultimum* on soybean. [J]. Phytopathology 1971, 61: 933-935.

[4] Pieczarka D J, Abawi G S. Influence of soil water potential and temperature on severity of *Pythium* root rot of snap beans[J]. Phytopathology 1978, 68: 766-772.

[5] Sippell D W, Hall R. Effects of pathogen species, inoculum concentration, temperature, and soil moisture on bean root rot and plant growth [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1982, 4(1): 1-7.

[6] Lai W, Allen G X, Elroy R C, et al. Pathogenicity of *Pythium* species in causing seed rot and damping-off in soybean under controlled conditions[J]. Phytoprotection, 2010, 91: 3-10.

[7] 魏嵘,李文滨,韩英鹏,等. 大豆品种对四种腐霉菌的抗性研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 971-975. (Wei L, Li W B, Han Y P, et al. Identification of resistance to four *Pythium* species in soybean cultivars [J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 971-975.)

[8] 郝再彬,荃品,徐伸. 植物生理学实验[M]. 北京:中国农业出版社, 2004. (Hao Z B, Chang J, Xu S. Plant physiology experiment [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004.)

[9] 张志良,瞿伟青. 《植物生理学实验指导》[M]. 北京:高等教育出版社, 2006. (Zhang Z L, Zhai W Q. Plant physiology experiment instruction [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.)

[10] 周研. 盐胁迫对大豆种子萌发,离子平衡及可溶性糖含量影响的研究[D]. 长春:东北师范大学, 2014. (Zhou Y. Research on germination, ionic balance and soluble sugars content of *Glycine max* under saline stress [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2014.)

[11] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis[J]. Molecular Plant, 2010, 3(1): 2-20.

[12] 徐鹏飞,常敬礼,赵福华,等. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后多酚氧化酶(PPO)活性变化[J]. 大豆科学, 2012, 31(1): 99-102. (Xu P F, Chang J L, Zhao F H, et al. Response of polyphenol oxidase activity in *Glycine soja* inoculated with *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Science, 2012, 31(1): 99-102.)