

大豆疫霉根腐病菌游动孢子侵染野生大豆下胚轴的细胞学观察

孙晓慧,徐鹏飞,张淑珍

(东北农业大学大豆研究所/大豆生物学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:用大豆疫霉根腐病菌的游动孢子悬浮液处理抗感不同野生大豆下胚轴,在接种后 1.5 ~ 24 h,使用扫描电镜观察了野生大豆与大豆疫霉菌的亲和非亲和性互作。结果显示:接种 1.5 h 后游动孢子在感病野生大豆下胚轴表面产生休止孢,并产生芽管;接种 3 h 后休止孢萌发产生附着孢,开始侵入下胚轴表皮;接种 6 h 后侵入加深;接种 12 h 后附着孢完全进入下胚轴表皮;接种 24 h 后附着孢孢膜已经开始进入到表皮里。游动孢子悬浮液处理抗病野生大豆后,其侵染过程与亲和反应相似,只是游动孢子在下胚轴表皮产生芽管时间和附着孢侵入下胚轴表皮层的时间比亲和反应迟。

关键词:大豆疫霉菌;野生大豆;侵染过程;超微结构

中图分类号:S565.1;Q932 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0430

Cytological Observation on Infection Process of Hypocotyls of Wild Soybeans by Zoospore of *Phytophthora sojae*

SUN Xiao-hui, XU Peng-fei, ZHANG Shu-zhen

(Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, China)

Abstract: The compatible and incompatible interactions between susceptible and resistant wild soybeans with zoospores of *Phytophthora sojae* race 1, the predominant race in Heilongjiang province at present were examined by electronmicroscopy, after inoculation from 1.5 to 24 h. The agerminating cysts were formed on hypocotyls of susceptible wild soybean at 1.5 h after inoculation, and appressoria began to penetrate into epidermis at 3 h, then totally into epidermis at 12 h. The appressoria membrane infected into epidermis at 24 h after inoculation. The infection process in incompatible interactions was similar to that in compatible interaction. However, the process of incompatible interactions was relatively late compared to that of compatible interaction.

Keywords: *Phytophthora sojae*; Wild soybean; Infection process; Ultrastructure

大豆疫霉根腐病是危害世界大豆生产的土传毁灭性病害之一^[1]。1991 年由沈崇尧和苏彦纯在我国首次分离成功^[2],迄今在我国东北、黄淮以及长江流域大豆产区也发现了该病害,对我国大豆生产造成了严重威胁^[3-5]。解析大豆疫霉菌在亲和与非亲和反应中的侵染机理,可为充分发掘抗性基因资源从而进行抗性育种奠定一定的理论基础。

大豆疫霉菌可以卵孢子或厚垣孢子的形式在土壤中存活很长时间,适宜的温度(25 ~ 30℃)和水分饱和的土壤是卵孢子萌发的有利条件,萌发后卵孢子产生孢子囊,孢子囊遇到水分饱和的条件会释放出里面的游动孢子,其到达根部后会成囊萌发,菌丝穿入到寄主表皮细胞壁间^[6]。而后在亲和和非亲和反应中侵染过程会有显著不同,最明显的差异特征是在感病品种中菌丝会形成大量吸器,并在细胞间扩展,而非亲和反应中寄主细胞迅速坏死,菌丝被限制在坏死细胞里,且很少有吸器的

形成^[6-8]。

前人对大豆疫霉菌侵染栽培大豆的过程超微观察有过系统报道^[7-9],本课题组对大豆疫霉根腐病菌侵染野生大豆后相关酶活性变化方面有过研究^[10-13]。我国野生大豆资源丰富且抗逆性强,本研究在前期已筛选出的抗感野生大豆的工作基础上^[14],拟用黑龙江省大豆疫霉根腐病菌 1 号优势生理小种处理抗感不同野生大豆的下胚轴,通过扫描电镜观察疫霉菌侵染野生大豆下胚轴的进程,为探明病原菌的致病机制及寄主的抗性机理提供细胞学资料,为深入了解野生大豆的抗性机理,充分利用我国的野生大豆资源,拓宽我国大豆抗性基因库提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆疫霉根腐病感病野生大豆材料

收稿日期:2017-01-22
基金项目:国家自然科学基金(31671719)。
第一作者简介:孙晓慧(1988 -),女,硕士,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail:18717989@qq.com。
通讯作者:张淑珍(1972 -),教授,博导,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail:zhangshuzhen@neau.edu.cn。

ZYD01153,抗病野生大豆材料 ZYD00388,相关农艺性状见徐鹏飞等^[15]。抗感鉴定标准参照 Yang 等^[16]。

供试病原菌为大豆疫霉菌 1 号生理小种,由大豆生物学教育部重点实验室分离保存,是黑龙江省目前的优势生理小种^[5]。

1.2 方法

1.2.1 野生大豆种植 具体种植方法参照徐鹏飞等^[15]进行。

1.2.2 胡萝卜(CA)培养基的配置 将新鲜的胡萝卜洗净,称取 200 g,切成小块放入植物组织搅碎机中搅成匀浆,加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸 30 min,过滤除去残渣,将 20 g 琼脂加入滤液中搅拌融化后,备用。

1.2.3 菌种的培养 将活化的疫霉菌 1 号小种接种于胡萝卜(CA)固体培养基的平皿中央,倒置于 25℃、黑暗培养 8~10 d,待菌丝长满培养皿的边缘时,放置到 4℃ 冰箱中待用。

1.2.4 游动孢子悬浮液的制备、接种与取样 按照

Ward 等^[17] 及 Yang 等^[16] 方法诱导游动孢子的产生,按照左豫虎等^[17]用大豆疫霉菌游动孢子接种大豆幼苗,黑暗条件下,25℃ 恒温保湿培养;切取接种处 10 mm 长的下胚轴段,于接种后 1.5,3,6,12,24 h 分别取样 1 次。以无菌蒸馏水处理的感病野生大豆植株为对照。

1.2.5 电镜样品的制备 参照左豫虎^[8]的方法,进行下胚轴电镜样品的制备。在日立 S-3400 扫描显微镜上进行样品观察和照相。电镜样品的制备和观察均在东北农业大学电镜中心完成。

2 结果与分析

2.1 大豆疫霉菌游动孢子侵染野生大豆下胚轴的症状观察

游动孢子接种野生大豆下胚轴后 24 h,感病野生大豆植株的子叶背面出现坏死斑,接种部位褐化,呈水渍状病斑,抗病野生大豆子叶与对照基本一致,保持绿色,只是在接种部位出现浅褐色的病斑(图 1)。



a: 接种后的感病野生大豆;b:接种后的抗病野生大豆;c:对照。
a: Inoculated susceptible wild soybean; b: Inoculated resistant wild soybean; c: Contrast.

图 1 大豆疫霉菌游动孢子悬浮液接种野生大豆下胚轴 24 h 症状
Fig.1 The symptoms of hypocotyls of wild soybeans after inoculation
of *P. sojae* zoospores 24 h postinoculation

2.2 大豆疫霉菌游动孢子侵染野生大豆下胚轴的扫描电镜观察

大豆疫霉菌游动孢子到达野生大豆下胚轴表面后,鞭毛脱落,形成休止孢。休止孢直接萌发形成芽管,并在下胚轴表皮细胞的凹陷部位形成附着孢,附着孢萌发从表皮细胞间入侵寄主:抗病野生大豆接种 1.5 h 后,游动孢子在其下胚轴表面产生休止孢,没有产生芽管(图 2),感病野生大豆接种 1.5 h 后,游动孢子在其下胚轴表面产生休止孢,并产生 3~5 个芽管(图 3)。接种 3 h 后,抗病野生大豆下胚轴表面的休止孢表面变的粗糙,产生芽管(图 4),感病野生大豆休止孢表面产生很多芽管,并有附着孢产生,小部分附着孢开始侵入下胚轴表皮(图 5)。从图 6 和 7 可以看出抗感野生大豆下胚轴

表皮的附着孢开始侵入,部分从下胚轴表皮的凹陷部分侵入,部分留在表皮外面,而感病野生大豆附着孢侵入下胚轴表面比抗病野生大豆深。接种后 12 h,抗病野生大豆附着孢的大部分已经进入下胚轴表皮,附着孢表皮中间凹陷,留下大部分的空孢膜(图 8),感病野生大豆的附着孢完全进入下胚轴表皮,余下少部分孢膜(图 9)。接种后 24 h,抗病野生大豆附着孢完全进入下胚轴表皮,只有孢膜留在下胚轴表皮(图 10),感病野生大豆附着孢已经完全进入下胚轴表皮层,并且孢膜已经开始进入到表皮里(图 11)。综上所述:游动孢子悬浮液处理抗感野生大豆后,在抗病野生大豆下胚轴表皮产生芽管时间和附着孢侵入下胚轴表皮层的时间比感病野生大豆迟。

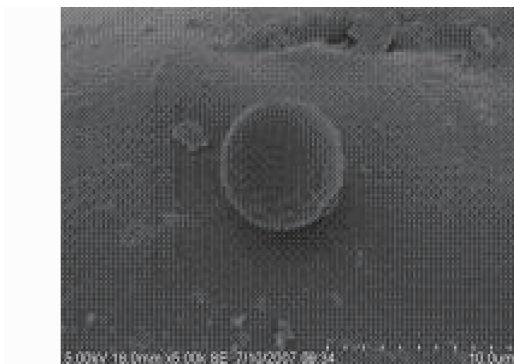


图2 接种 1.5 h 后游动孢子在抗病野生大豆下胚轴表面形成休止孢(4500 ×)
Fig.2 Formation of agerminating cysts on hypocotyls of resistant wild soybean 1.5 h postinoculation(4500 ×)

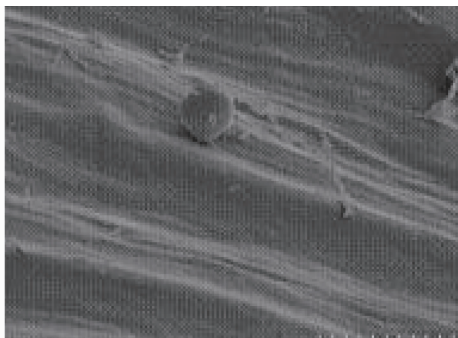


图3 接种 1.5 h 后感病野生大豆下胚轴表面休止孢产生芽管(3000 ×)
Fig.3 Formation of tube from agerminating cysts on hypocotyls of susceptible wild soybean 1.5 h postinoculation (3000 ×)

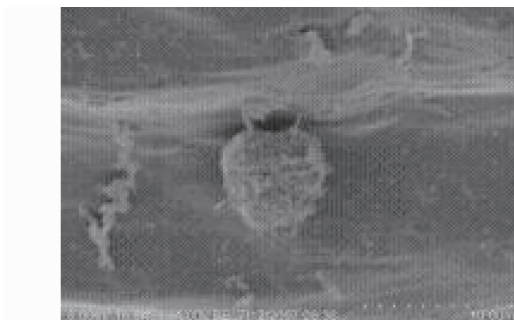


图4 接种 3 h 后抗病野生大豆下胚轴表面休止孢产生芽管(4500 ×)
Fig.4 Formation of tube from agerminating cysts on hypocotyls of resistant wild soybean 3 h postinoculation(4500 ×)

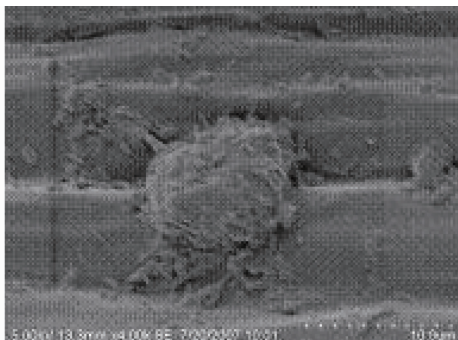


图5 接种 3 h 后感病野生大豆下胚轴表面产生附着孢(4500 ×)
Fig.5 Formation of appressoria on hypocotyls of susceptible wild soybean 3 h postinoculation(4500 ×)

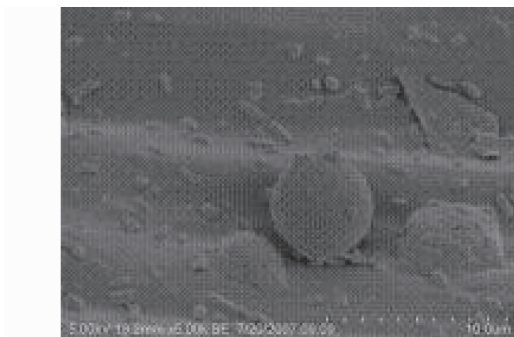


图6 接种 6 h 后附着孢入侵抗病野生大豆下胚轴表面(4500 ×)
Fig.6 Penetration of appressoria on hypocotyls of resistant wild soybean 6 h postinoculation(4500 ×)

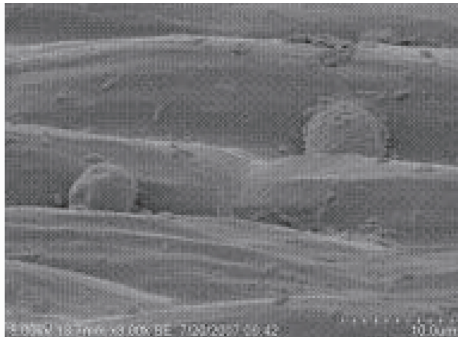


图7 接种 6 h 后附着孢入侵感病野生大豆下胚轴表面(4500 ×)
Fig.7 Penetration of appressoria on hypocotyls of susceptible wild soybean 6 h postinoculation(4500 ×)

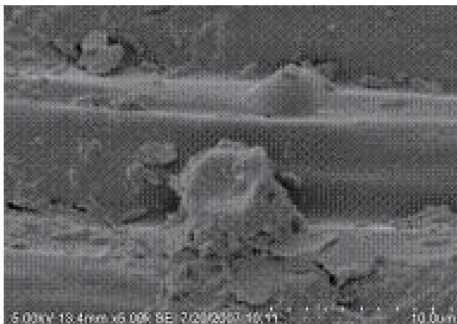


图 8 接种 12 h 后附着孢入侵抗病野生大豆下胚轴表面(4500 ×)

Fig.8 Penetration of appressoria on hypocotyls of resistant wild soybean 12 h postinoculation (4500 ×)

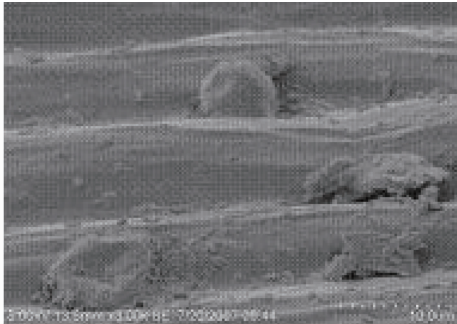


图 9 接种 12 h 后附着孢入侵感病野生大豆下胚轴表面(4500 ×)

Fig.9 Penetration of appressoria on hypocotyls of susceptible wild soybean 12 h postinoculation (4500 ×)

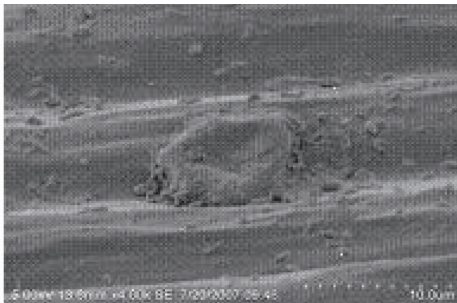


图 10 接种 24 h 后附着孢完全进入抗病野生大豆下胚轴表皮(4500 ×)

Fig.10 Penetration of appressoria totally into epidermis of hypocotyls of resistant wild soybean 24 h postinoculation (4500 ×)

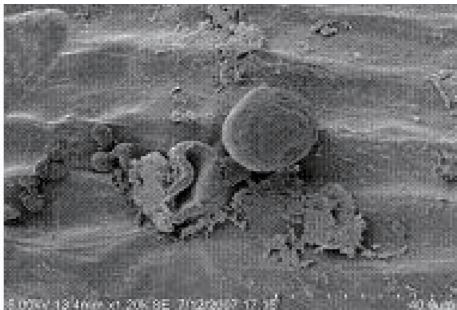


图 11 接种 24 h 后孢膜已经开始进入到感病野生大豆下胚轴表皮(4500 ×)

Fig.11 Penetration of appressoria membrane into epidermis of hypocotyls of susceptible wild soybean 24 h postinoculation (4500 ×)

3 结论与讨论

Enkerli 等^[7]曾用光学和电子电镜对 2 个大豆近等基因系(含有 *Rps1a* 或 *Rps1b*)接种大豆疫霉菌 2 号和 8 号生理小种后的根部变化做了细致的研究。其中 2 号生理小种对含 *Rps1b* 的植株是有毒性的,对含 *Rps1a* 的大豆植株是无毒的;8 号小种则相反。所有的小种和品种的组合都在接种后 30 min ~ 20 h 内观察,无论在亲和和非亲和的反应中,游动孢子的成囊、萌发及侵染都在接种后 30 min 内完成,且都没有附着胞形成,与菌丝相邻的表皮细胞内细胞壁沉积物频繁出现。接种后 4 h,抗感品种间开始出现明显差异,随着接种时间的延长,抗感品种对病原菌的反应差异日趋明显。在亲和反应中,感病大豆中疫霉菌形成一个短暂的活体营养阶段,同时在细胞内产生许多吸器,但在接种后 10 h 之内不会引起寄主明显的细胞皮层反应。接种后 15 h,感病品种整个根部细胞几乎坏死,出现大量细胞壁附加物,且在维管组织中定殖。在非亲和反应中的明显特点是几乎没有疫霉菌的吸器形成,并出现快

速的寄主细胞坏死,在侵染 4 h 内形成了很多细胞壁附加物,病原菌很少穿过抗病品种的根部内皮层细胞,也很少在维管束组织中定殖。上述结果表明大豆对疫霉菌的抗性与寄主细胞的坏死、形成细胞壁附加物以及几乎对根部无侵染相关。左豫虎等^[8]用光镜和电镜观察大豆品种垦农 4 号和 857-1 下胚轴对 Ps411 菌株在接种后 1.5 ~ 24 h 的反应,其中 Ps411 菌株对垦农 4 号不具毒性,对 857-1 有毒。在亲和反应中,接种 3 h 后,附着孢萌发产生的入侵结构,从表皮细胞间隙入侵寄主组织的病菌侵入表皮层细胞,且可观察到细胞壁沉积物,菌丝通过细胞间隙向皮层组织扩展。接种后 3 ~ 6 h 菌丝由表皮层进入皮层组织,菌丝主要以胞间扩展的形式在皮层组织中生长,并形成吸器。在非亲和反应中,菌丝在皮层组织扩展过程中,可观察到明显的胞壁沉积物。由此可见,疫霉菌侵染大豆根部的过程与浸染下胚轴的过程大体一致,且下胚轴组织中病菌的受抑制程度和寄主细胞的结构防卫反应似乎比根部组织更为显著。因而,大豆下胚轴组织对疫霉菌侵染的反应可能更客观地反映了对疫霉病

的抗性程度。

本研究用黑龙江省大豆疫霉根腐病菌的1号优势生理小种处理抗感不同野生大豆,经扫描电镜观察。游动孢子悬浮液处理野生大豆1.5 h后,游动孢子在感病野生大豆下胚轴表面产生休止孢,并产生芽管;3 h后休止孢萌发产生附着孢,开始侵入下胚轴表皮;6 h后侵入加深;12 h后附着孢完全进入下胚轴表皮;24 h后附着孢孢膜已经开始进入到表皮里。游动孢子悬浮液处理抗病野生大豆后的侵染过程与亲和反应相似,只是游动孢子在下胚轴表皮产生芽管时间和附着孢侵入下胚轴表皮层的时间比亲和反应迟。无论对于抗感栽培大豆品种,游动孢子的成囊、萌发、侵染都可以在30 min内完成^[7],而本研究发现大豆疫霉菌游动孢子从成囊、萌发到侵染野生大豆下胚轴表皮的时间都长于前人的研究结果,有可能是野生大豆下胚轴韧皮部和木质部较硬,侵染时所受到的阻碍大造成的。关于大豆疫霉菌游动孢子侵染抗感不同野生大豆下胚轴后,其菌丝在其表皮细胞内扩展、形成吸器以及细胞超微结构的变化,还有待深入研究。

参考文献

[1] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69(4): 362-368.

[2] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(3): 298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary study of *Phytophthora sojae* in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(3): 298).

[3] 朱振东, 王化波, 王晓鸣, 等. 中国大豆疫霉菌分布及毒力多样性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(7): 793-799. (Zhu Z D, Wang H B, Wang X M, et al. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(7): 793-799).

[4] 陈庆河, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病菌病原鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 112-116. (Chen Q H, Weng Q Y, Wang Y C, et al. Pathogen identification and ribosomal DNA-ITS sequence analysis of soybean *Phytophthora* blight in Fujian[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2): 112-116.)

[5] Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Races of *Phytophthora sojae* and their virulences on commonly grown soybean varieties in Heilongjiang, China[J]. Plant Disease, 2010, 94: 87-91.

[6] Beagle-Ristaino J E, Rissler J F. Histopathology of susceptible and resistant soybean roots inoculated with zoospores of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*[J]. Phytopathology, 1983, 73:

590-595.

[7] Enkerli K, Mims C W, Hahn M G. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*[J]. Canadian Journal of Botany, 1997, 75(9): 1493-1508.

[8] 左豫虎, 康振生, 黄丽丽, 等. 大豆疫霉菌对大豆下胚轴侵染过程的细胞学研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 235-241. (Zuo Y H, Kang Z S, Huang L L, et al. Cytology on infection process of soybean hypocotyls by *Phytophthora sojae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(3): 235-241.)

[9] 葛秀秀. 大豆抗疫霉根腐病机制的初步研究[M]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001. (Ge X X. Study on resistance mechanism of soybeans infected by *Phytophthora sojae*[J]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2001.)

[10] 程鹏, 徐鹏飞, 范素杰, 等. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后过氧化物酶(POD)活性变化[J]. 大豆科学, 2013, 32(2): 197-201. (Cheng P, Xu P F, Fan S J, et al. Response of POD activity in *Glycine soja* inoculated by *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Science, 2013, 32(2): 197-201.)

[11] 方东鹏, 靳立梅, 董利东, 等. 野生大豆接种大豆疫霉菌后木质素含量的变化[J]. 大豆科学, 2015, 34(1): 99-103. (Fang D P, Jin L M, Dong L D, et al. Change of lignin content in wild soybeans inoculated with *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Science, 2015, 34(1): 99-103.)

[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): 99-103. (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: 99-103.)

[13] 王欣, 靳丽梅, 徐鹏飞, 等. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后总多酚含量的变化[J]. 作物杂志, 2012(4): 78-82. (Wang X, Jin L M, Xu P F, et al. Response of total polyphenol activity in wild soybean inoculated by *Phytophthora sojae*[J]. Crops, 2012(4): 78-82.)

[14] 靳立梅, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 野生大豆种质资源对大豆疫霉根腐病抗性评价[J]. 大豆科学, 2007, 26(3): 300-304. (Jin L M, Xu P F, Wu J J, et al. Identification the resistance of wild soybean germplasm to *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Science, 2007, 26(3): 300-304.)

[15] 徐鹏飞, 吴俊江, Allen X, 等. 大豆疫霉根腐病菌游动孢子侵染野生大豆下胚轴的透射电镜观察[J]. 大豆科学, 2012, 32(1): 462-465. (Xu P F, Wu J J, Allen X, et al. Ultrastructure of hypocotyls of *Glycine soja* infected with zoospores of *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Science, 2012, 32(1): 462-465.)

[16] Yang X B. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields[J]. Plant Disease, 1996, 80: 1418-1420.

[17] Ward E W B, Lazarovits G, Unwin C H, et al. Hypocotyl reactions and glyceollin in soybeans inoculated with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology[J]. 1979, 69: 951-955.