

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

徐鹏飞¹, 吴俊江², Allen G. Xue³, 靳立梅¹, 王金生², 张小明¹, 李文滨¹, 张淑珍¹

(1. 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; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 加拿大农业部 加东谷物与油料研究中心, 加拿大 渥太华 K1A 0C6)

摘要:用大豆疫霉根腐病菌的游动孢子悬浮液处理抗感性不同的野生大豆下胚轴, 接种后 3~72 h, 用透射电镜观察野生大豆与大豆疫霉菌的亲性和非亲性和性互作中细胞超微结构的变化。结果表明: 接种后 3~36 h, 感病野生大豆随接种时间延长下胚轴细胞器结构破坏严重, 而抗病野生大豆细胞结构基本完整; 接种后 48 h, 抗病野生大豆的细胞壁物质累加, 出现胞壁沉积物, 而感病野生大豆细胞壁出现部分降解; 接种后 72 h, 抗病野生大豆细胞质壁分离, 但细胞器结构基本完整, 感病野生大豆细胞器几乎无完整的结构。

关键词:大豆疫霉菌; 野生大豆; 超微结构

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)03-0462-04

Ultrastructure of Hypocotyls of *Glycine soja* Infected with Zoospores of *Phytophthora sojae*

XU Peng-fei¹, WU Jun-jiang², Allen G. XUE³, JIN Li-mei¹, WANG Jin-sheng², ZHANG Xiao-ming¹, LI Wen-bin¹, ZHANG Shu-zhen¹

(1. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 2. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China; 3. Eastern Cereal and Oilseed Research Centre Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa K1A 0C6, Canada)

Abstract: The ultrastructures of hypocotyls of resistant and susceptible wild soybeans infected with zoospores of *Phytophthora sojae* from 3 to 72 h after inoculation were observed using transmission electron microscopy in this paper. The results showed that the cell structures of the susceptible wild soybean were seriously destroyed with the inoculation time from 3 to 36 h, but those of the resistant one were almost intact. The sediments on the cell wall of the resistant soybean could be seen at 48 h after inoculation, but no sediments could be seen for the susceptible one and its cell wall began to degrade to some extent. Although there was plasmolysis at 72 h after inoculation, the cell structures were almost intact for the resistant wild soybean. However, there were nearly no intact cell structures for the susceptible ones. The results could provide theoretical basis on cytology for clarification of pathogenic mechanism of *P. sojae* to wild soybeans.

Key words: *Phytophthora sojae*; Wild soybean; Ultrastructure

大豆疫霉根腐病是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的世界范围大豆病害^[1]。我国自 1991 年正式报道发现大豆疫霉菌^[2], 目前该病已对我国大豆生产构成了严重威胁^[3-5]。抗性育种是解决该病害最为经济有效的措施, 而了解大豆疫霉菌在亲与非亲和反应中的侵染机理, 可以为阐明病原菌的致病机理奠定一定的基础, 对充分发掘抗性基因资源进而培育抗性品种有着重要的理论指导意义。

对于大豆疫霉根腐病菌对寄主的侵染过程, 早在 1997 年 Enkerli 等^[6]就曾对大豆疫霉菌侵染栽培

大豆根部的侵染过程做过较系统的研究。左豫虎等^[7]对大豆疫霉菌侵染栽培大豆下胚轴的过程也有过报道。结果表明大豆疫霉菌侵染大豆根部和下胚轴组织的过程基本一致, 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比根部组织更为显著^[6-7]。因而, 大豆下胚轴组织的变化能更客观地反映对疫霉病的抗性程度^[7]。

虽然前人对大豆疫霉菌侵染栽培大豆的过程有过研究^[6-8], 但对疫霉菌侵染后细胞超微结构的变化却鲜有报道。葛秀秀^[9]用黑龙江大豆疫霉菌 1

收稿日期: 2011-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(309T1811, 31071439, 31171577, 31110103001), 教育部新世纪人才培养计划(NCET-09-164); 黑龙江省自然科学基金(C200814); 黑龙江省博士后养基金(ORB06-010); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511041)。

第一作者简介: 徐鹏飞(1980-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail: xupf2008@163.com。

通讯作者: 张淑珍(1972-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail: dnzhshzh@163.com。

号生理小种处理抗感不同栽培大豆品种,经透射电镜观察,发现抗、感大豆品种之间在细胞内部结构上的差异。

我国存在着丰富的野生大豆资源,利用野生资源拓宽栽培大豆抗疫霉根腐病遗传基础,可填补栽培大豆品种单一化所导致大豆品种抗性狭窄的问题。鉴于此,该研究采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,通过透射电镜观察疫霉菌侵染野生大豆后下胚轴细胞器的结构变化,以期了解大豆疫霉根腐病菌对野生大豆的作用方式,揭示野生大豆的抗病机理奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 病原菌 大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种,是黑龙江省目前的优势生理小种^[5],由大豆生物学教育部重点实验室分离、鉴定和保存。

1.1.2 大豆材料 抗病野生大豆 ZYD00388,感病野生大豆 ZYD01153,由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供。

1.2 试验方法

1.2.1 野生大豆幼苗的培育 野生大豆种子浸入 2.75% NaClO 水溶液中表面消毒 3 min,再浸入 70% 酒精中 1 min,最后用无菌水冲洗数次,晾干,用机械微破种皮,促进种子萌发,每个材料分别取 6 粒种子播种于掺入草炭土的灭菌的蛭石中,播种盆钵直径为 8 cm,置于生长箱中培养,温度 25℃,50% 的相对湿度,每天光照 14 h。

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 将培养基和培养皿在一个大气压下灭菌 20 min 后,放置于超净工作台冷却,再将 15 mL CA 培养基倒入直径为 10 cm 的灭菌培养皿中,冷却后制成 CA 固体培养基,然后用接种针将活化的病原菌接种于平皿中央,倒置于 25℃ 温箱中培养 10 d。

1.2.4 游动孢子悬浮液的制备 参照左豫虎等^[11]的方法,略有改动:用打孔器在菌落边缘内侧打孔,挑取 8~10 块菌饼转入灭菌的三角瓶内,加入 20 mL CA 液体培养基,25℃ 黑暗培养 3 d 后,换到土壤浸出液中,光暗交替。25℃ 培养 1~2 d 可见大量孢子囊形成。将产生大量孢子囊的三角瓶内的

土壤浸出液置换成 20 mL 无菌蒸馏水,置 4℃ 冰箱中 20~30 min 后,取出置于 25℃ 培养,30 min 后即有大量游动孢子释放,6 h 后游动孢子大量产生。用无菌水配制成浓度大约为 1×10^5 个孢子 \cdot mL⁻¹ 游动孢子悬浮液,置室温下保存待用。

1.2.5 野生大豆幼苗的接种与取样 取生长 6 d 的幼苗,用水将盆土充分浸泡,将泥土轻轻倒出,用流水慢慢冲洗,洗净根上所有附泥,将整个幼苗植株平放在铺有灭菌纱布的托盘中,将一片载玻片放置于下胚轴处,并在子叶节下 2 cm 处下胚轴上滴加浓度约为 1×10^5 个 \cdot mL⁻¹ 的游动孢子悬浮液,隔段时间补充孢子悬浮液,确保整个接种期间条件一致。25℃ 培养,100% 保湿,14 h 光照,光照强度 $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;分别于接种后 3、6、12、24、36、48、60、72 h 取样,切取接种处约 2 mm 长的下胚轴段,以作电镜样品制备。以无菌蒸馏水处理的抗感野生大豆植株为对照。

1.2.6 电镜样品的制备 将样品用双面刀片切成 2×5 mm 的小条,加入 2.5% ,pH 6.8 戊二醛固定并置于 4℃ 冰箱中固定 1.5 h,用 0.1 mL pH 6.8 磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min,而后进行脱水、置换、浸透、聚合、切片、染色后,用 E-1010(Giko)型离子溅射镀膜仪在样品表面镀上一层 1 500 nm 厚的金属膜。LKB-V 型超薄切片机切片,酷酸双氧柠檬酸铅双重染色,JME-1200Ex 型透射电子显微镜观察,拍照。电镜样品制备和拍照均在东北农业大学电镜实验中心完成。

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

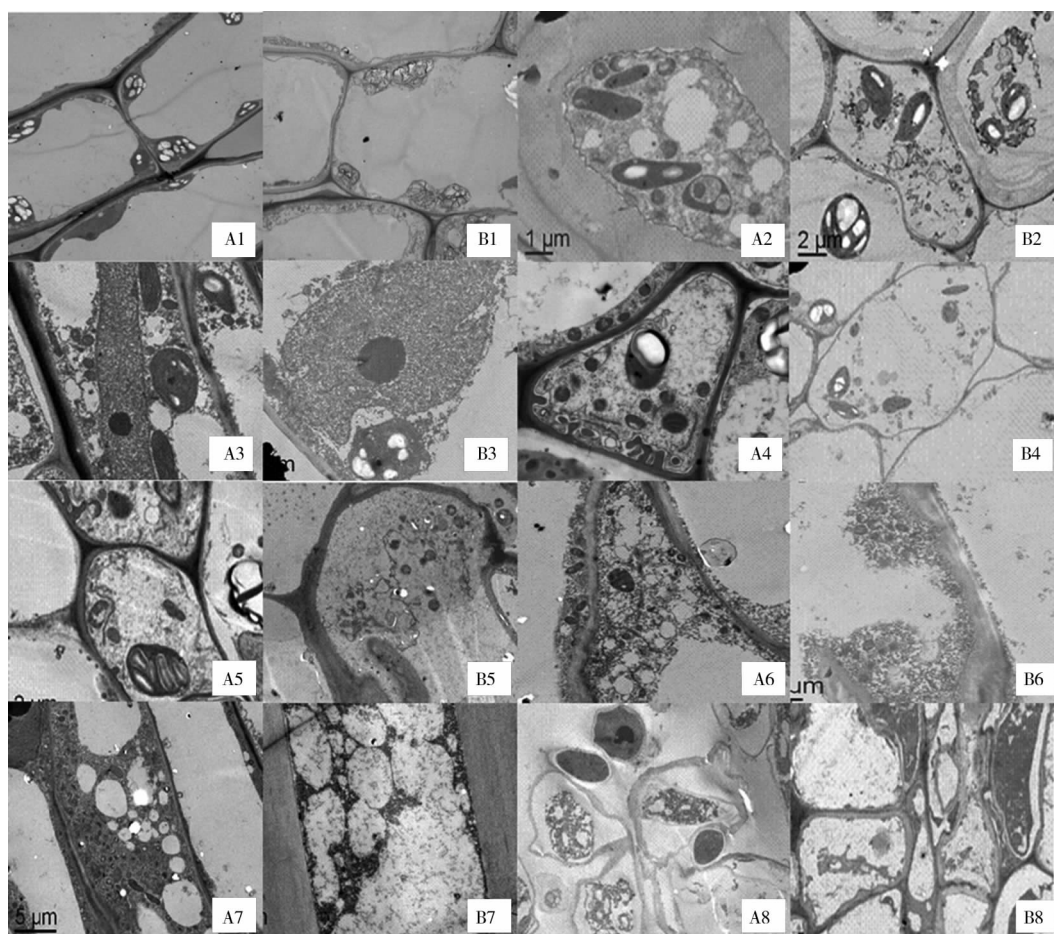
无菌蒸馏水处理过的抗感野生大豆在整个实验过程中,生长健壮;疫霉菌游动孢子接种后 24 h,感病野生大豆在接种处出现浅褐色的水渍状病斑,并沿下胚轴上下扩展,子叶背面出现坏死斑;接种后 48 h,接种部位水渍状病斑逐渐扩展;72 h,接种部位缢缩,整个植株萎蔫死亡。游动孢子接种后 24 h,抗病野生大豆在接种部位出现红褐色病斑,直到 72 h,病斑扩展缓慢,子叶背面出现少量的坏死斑,植株生长相对健壮。

2.2 大豆疫霉菌游动孢子侵染野生大豆下胚轴的透射电镜观察

对大豆疫霉根腐病菌游动孢子处理抗、感不同野生大豆叶片超微结构的观察,可以有助于探明病原菌在细胞水平和亚细胞水平上的致病作用及揭示抗、感植株在细胞水平上的抗病差异。

由图 1 可以看出,接种后 3 h,抗感野生大豆细胞器及基质基本完整,没有明显的被破坏现象(A1, B1);接种后 6 h,抗病野生大豆叶绿体、线粒体结构完整,核仁清晰(A2),感病野生大豆部分叶绿体出现畸形,部分线粒体出现空泡化(B2);接种后 12 h,抗病野生大豆核膜、核仁没有太大变化(A3),感病野生大豆核仁变大,核膜变形(B3);接种后 24 和 36 h,抗病野生大豆下胚轴内部细胞结构基本完整(A4, A5),感病野生大豆下胚轴细胞器结构遭到了明显的破坏,叶绿体基粒片层消失,大部分叶绿体膜也逐渐解体,线粒体膜也解体,内含物减少,空

泡化(B4, B5);接种后 48 h,抗病野生大豆的细胞壁物质累加,出现胞壁沉积物(A6),而感病野生大豆细胞壁出现部分降解,原生质呈粗糙的颗粒状,胞壁沉积物紊乱(B6);接种后 60 h,抗病野生大豆下胚轴细胞器都有很大的变化,抗病野生大豆线粒体出现部分空泡化(A7),而感病野生大豆叶绿体基粒片层结构遭到破坏,线粒体空泡化严重,细胞结构混乱(B7)。接种后 72 h,抗病野生大豆细胞质壁分离,但细胞器结构基本完整(A8),而感病野生大豆细胞器几乎无完整的结构(B8)。



A、B 分别为抗病和感病野生大豆;1、2、3、4、5、6、7、8
分别表示接种后 3、6、12、24、36、48、60、72 h 的下胚轴超微结构。

A and B represents resistant and susceptible wild soybean;1,2,3,4,5,6,7,8
represents 3,6,12,24,36,48,60,72 h after inoculation, respectively.

图 1 抗感野生大豆接种大豆疫霉菌游动孢子 3 ~ 72 h 下胚轴超微结构

Fig. 1 The ultrastructure of hypocotyls of resistant and susceptible wild soybean infected with zoospores of *P. sojae* at 3 ~ 72 h after inoculation

3 结论与讨论

越冬的卵孢子是大豆疫霉菌的初侵染源,卵孢子可以在土壤中长期存活,水分饱和的土壤和 25 ~ 30°C 的温度有利于卵孢子的萌发和孢子囊的形成。当环境条件适宜时,卵孢子萌发产生孢子囊

并释放游动孢子借助水流到达大豆根部,一旦游动孢子接触到根部,它们会成囊萌发(失去鞭毛),而后菌丝直接穿入到寄主表皮的细胞壁间^[6];在非亲和反应中,寄主发生过敏反应,病原菌菌丝多被限制在坏死的或死亡的细胞里,并且没有吸器的扩展^[6,8];在亲和反应里,大豆疫霉菌并没有引发寄主

的任何反应,菌丝在细胞间生长,并在根细胞内形成很多吸器^[8]。大豆疫霉菌侵染大豆根部和下胚轴组织的过程基本一致,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对疫霉病的抗性程度^[7]。

虽然前人在大豆疫霉根腐病菌对栽培大豆的侵染过程超微观察有过系统研究,但疫霉菌侵染后细胞超微结构的变化报道还很少,葛秀秀^[9]用透射电镜观察大豆疫霉菌根部接种抗感不同大豆品种后细胞超微结构,结果表明感病品种处理后 48 h,细胞壁大多降解,原生质呈粗糙的颗粒状,细胞核仁体积变大,核膜变形;抗病品种处理后 48 h,细胞大体完整,细胞壁物质累加,叶绿体迅速成熟,粗糙型内质网增多,核糖体含量相应增加。该研究结果表明,疫霉菌游动孢子接种抗感野生大豆后 48 h,抗病野生大豆的细胞壁物质累加,出现胞壁沉积物,这与葛秀秀^[9]的研究结果相类似;感病野生和栽培大豆细胞壁降解程度不同,野生大豆细胞壁出现部分降解,而栽培大豆细胞壁大部分降解^[9],这可能是由于接种方法不同以及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。

该研究用黑龙江省大豆疫霉根腐病菌的 1 号优势生理小种游动孢子处理抗感不同野生大豆,经透射电镜观察,抗感野生大豆细胞器变化差异明显,接种后 72 h,抗病野生大豆细胞质壁分离,但细胞器结构基本完整。感病野生大豆细胞器几乎无完整的结构。研究结果可为了解大豆疫霉根腐病菌对野生大豆的作用方式,阐明病原菌对野生大豆致病的机制提供细胞学资料,为揭示病原菌的致病机制奠定一定的理论基础。

参考文献

[1] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytoph-*

thora 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 studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1991, 21 (3): 298.)
- [3] 韩晓增,何志鸿,张增敏. 大豆主要病虫害防治技术[J]. *大豆通报*, 1998 (6): 5-6. (Han X Z, He Z H, Zhang Z M. The prevention technique of main disease and pests of soybean [J]. *Soybean Bulletin*, 1998 (6): 5-6.)
- [4] 朱振东,王晓鸣,常汝镇,等. 黑龙江省大豆疫霉菌生理小种鉴定及大豆种质的抗性评价[J]. *中国农业科学*, 2000, 33 (1): 62-67. (Zhu Z D, Wang X M, Chang R Z, et al. Identification of race of *Phytophthora sojae* and reaction of soybean germplasm resources in Heilongjiang province [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33 (1): 62-67.)
- [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] 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.
- [7] 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.)
- [8] 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.
- [9] 葛秀秀. 大豆抗疫霉根腐病机制的初步研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001. (Ge X X. Study on resistance mechanism of soybeans infected by *Phytophthora sojae* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2001.)
- [10] Yang X B. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields [J]. *Plant Disease*, 1996, 80: 1418-1420.
- [11] 左豫虎,臧忠婧,刘惕若. 影响大豆疫霉菌游动孢子产生的条件[J]. *植物病理学报*, 2001, 31 (3): 241-245. (Zuo Y H, Zang Z J, Liu T R. Studies on production condition of zoospores of *Phytophthora sojae* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31 (3): 241-245.)