

## 疫霉根腐病菌毒素对大豆不同组织中总多酚含量的影响

程莹鑫<sup>1</sup>, 梁吉利<sup>2</sup>, 刘庆莉<sup>3</sup>, 董利东<sup>1</sup>, 李文滨<sup>1</sup>, 范素杰<sup>1</sup>, 徐鹏飞<sup>1</sup>, 张淑珍<sup>1</sup>

(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 黑河分院, 黑龙江 黑河 164300; 3. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:** 对大豆疫霉根腐病菌毒素胁迫下抗感不同大豆品种根、茎、叶中总多酚的含量进行了初步研究。结果表明: 适宜浓度的毒素(稀释100倍, 浓度为 $0.089\ 7\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )处理后, 抗病品种根、茎和叶中总多酚在病程的大部分阶段与对照相比升高; 而感病品种在整个病程中虽然在某些阶段较对照有一定的提高, 但幅度不大, 在病程其他阶段总多酚下降幅度远大于升高幅度。说明适宜浓度的大豆疫霉菌毒素可以起到激发子作用。

**关键词:** 大豆; 大豆疫霉根腐病; 毒素; 总多酚

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0524

## Changes of Total Polyphenol Content in Soybean Treated by Pathotoxin Produced by *Phytophthora sojae*

CHENG Ying-xin<sup>1</sup>, LIANG Ji-li<sup>2</sup>, LIU Qing-li<sup>3</sup>, DONG Li-dong<sup>1</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>, FAN Su-jie<sup>1</sup>, XU Peng-fei<sup>1</sup>, ZHANG Shu-zhen<sup>1</sup>

(1. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, China; 2. Heihe Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China; 3. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** In this study, changes of total polyphenol content of nine soybean cultivars with different resistance treated by the pathotoxin of *Phytophthora sojae* was investigated. The results showed that the total polyphenol content in roots, stems, and leaves of resistant soybean cultivars treated by the pathotoxin with optimal concentration (Diluted to 100 times and the concentration was  $0.089\ 7\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was higher than that of the control at most of the pathogenic stages. The total polyphenol content in susceptible soybean cultivars increased compared with that in the control at some of the pathogenic stages, but decreased at most of the pathogenic stages. It shows that appropriate concentration of pathotoxin produced from *P. sojae* may play an important role as an elicitor in resistance to pathogen infection.

**Key words:** Soybean; *Phytophthora sojae*; Pathotoxin; Total polyphenol

大豆疫霉根腐病是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的对大豆危害较大的世界范围土传病害<sup>[1]</sup>, 该病使大豆减产10%~40%, 严重的甚至绝产<sup>[2]</sup>。近年, 已成为严重影响黑龙江省大豆生产的重要病害<sup>[3]</sup>。在适宜环境条件下, 疫霉菌对大豆致病能力的大小取决于它们所具有致病因子的多少和活性的大小<sup>[4]</sup>。病原生物的致病因子主要包括: 酶、毒素和激素<sup>[5-6]</sup>。根据植物病原菌毒素对寄主致病范围不同, 可将其分为寄主专化性毒素和非寄主专化性毒素<sup>[7-8]</sup>。非寄主专化性毒素在一定浓度下能引起寄主植物的敏感性反应, 这种反应能区分寄主植物的抗病性差异<sup>[9]</sup>。研究表明, 大豆疫霉根腐病菌毒素是一种非寄主专化性毒素, 用适宜浓度毒素代替病原菌可以进行相关研究<sup>[10]</sup>。

在大豆与疫霉菌的互作中, 寄主可通过产生植

保素和病程相关蛋白来增强抗性<sup>[11-12]</sup>。总多酚(polyphenol)是植物体内重要的植保素之一。在植物正常生理条件下酚类物质对病原物的毒性并不高<sup>[13]</sup>。当受到病原菌侵染时, 它们在植物体内积累<sup>[14]</sup>。在水稻与纹枯病菌的互作中, 感病品种在侵染早期积累酚类物质, 以后酚类物质减少, 而抗病品种则相反<sup>[15]</sup>。徐兆飞和刘亚光<sup>[16]</sup>研究表明当灰斑病菌侵染抗感不同的大豆叶片时, 感病品种叶片内总多酚含量变化与对照相比呈下降趋势, 而抗病品种则相反。杨辉等<sup>[17]</sup>对不同抗性的辣椒品系接种黄瓜花叶病毒(CMV)后, 总多酚的相对含量整体上呈上升趋势, 各品系间的差异显著。

毒素是疫霉根腐病菌主要的致病因子之一, 迄今为止, 在疫霉菌毒素胁迫下, 大豆中总多酚的变化还未见报道。本研究以适宜浓度的毒素处理抗

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 国家自然科学基金(31071439, 31171577, 31101167); 黑龙江省杰出青年基金(JC201308); 长江后备支持计划; 龙江学者基金; 哈尔滨市科技创新项目(2012RFQXN011, 2012RFXN019)。

第一作者简介: 程莹鑫(1988-), 女, 硕士, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。

通讯作者: 张淑珍(1972-), 女, 博士, 博士生导师, 教授, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: dznzhshzh@163.com。

感不同大豆品种后分析总多酚的变化,以期为大豆抗疫霉根腐病生理生化机制的研究奠定一定的理论基础,同时为疫霉根腐病菌毒素致病机理的研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 病原菌 大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种,该小种是黑龙江省目前的优势生理小种<sup>[17]</sup>,由大豆生物学教育部重点实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 供试大豆品种 东农 46(抗)、绥农 8 号(抗)、绥农 10 号(抗)、绥农 15(抗)、黑农 37(中感)、东农 42(感)、东农 40567(感)、合丰 25(感)、合丰 35(感),种子由大豆生物学教育部重点实验室及黑龙江省农业科学院提供。上述大豆品种抗感类型的确定参照疫霉根腐病菌 1 号生理小种下胚轴接种后的鉴定结果,并参照 Yang 等<sup>[18]</sup>研究中报道的抗感标准。

### 1.2 试验方法

1.2.1 病菌的培养及毒素的提取 制备直径为 9 cm 的胡萝卜平板培养基(CA 培养基),在无菌条件下将保存在试管内的大豆疫霉根腐病菌转移到平板上,在 25℃、黑暗的培养箱中培养 10 d 后,将菌落打成 12 mm 的菌丝块,产毒培养参照张淑珍等<sup>[19]</sup>的方法,即在无菌条件下接种到 pH6.5 装有 50 mL Fries 培养基的三角瓶中,每瓶接种 10 个菌丝块,在 28℃、静止、半光照下培养 10 d。毒素的提取参照高必达等<sup>[20]</sup>的方法,将培养液经滤纸过滤后,用等体积的分析纯乙醚萃取 3 次,合并乙醚相,将萃取液在 38℃ 用旋转蒸发器减压蒸发,用 100 mL 无水乙醇溶解残渣,再次旋转蒸发除去残渣中的水分,最终产物用无菌水溶解,定容至培养物滤液总体积的 1/100,即为毒素母液<sup>[21]</sup>。

将毒素母液用无菌水稀释 100 倍,配制成浓度为 0.089 7 mg·mL<sup>-1</sup> 的毒素溶液,研究表明该浓度毒素处理大豆切根苗与病原菌下胚轴接种时结果一致<sup>[22]</sup>。

1.2.2 大豆苗的种植、毒素处理及取样方法 将灭菌的土:蛭石(1:1)装入直径为 10 cm 的小钵中,共 45 钵,取饱满、无斑驳大豆籽粒,每个品种 6 钵,每钵 6 株,在培养箱中培养(360 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 光强下 16 h 光照/8 h 黑暗,白天 25℃,晚上 20℃)10 d。取真叶完全展开的大豆幼苗,在流水下轻轻洗净根部,浸于粗提的大豆疫霉根腐病菌毒素溶液中,另设无菌水处理幼苗为对照,3 次重复。在毒素处理后 24、36、48、60 和 72 h 取样,每个时期取 6 株,用

液氮冷冻后,保存在 -20℃ 的冰柜中用于总多酚的提取和含量的测定。

1.2.3 总多酚类物质含量测定 总多酚类物质含量的测定参照李合生<sup>[23]</sup>的方法,再根据公式计算出总多酚物质含量的变化率,公式如下:

$$\text{总多酚物质含量变化率}(\%) = [(A1 - A0) / A0] \times 100$$

其中, A1 为接种后供试品种根、茎、叶总多酚物质含量(OD<sub>470</sub> nm/g. fr. w. min. cm); A0 为未接种植株根、茎、叶总多酚物质含量(OD<sub>470</sub> nm/g. fr. w. in. cm)。

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2007 进行数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 根总多酚含量变化趋势

从图 1 可以看出,毒素处理后,抗感不同品种根中总多酚含量变化趋势有较大差别。抗性品种东农 46 在处理 60 h 内根中总多酚含量均高于对照,绥农 8 号根中总多酚含量出现了双峰,绥农 10 号和绥农 15 根中总多酚的含量是先表现降低而后升高的趋势,感病品种合丰 25 根中总多酚含量呈 M 型变化趋势,总体而言,抗病品种根中总多酚含量在病程的大部分阶段比对照增加,而感病品种则相反。中感品种黑农 37 在整个病程中呈现双峰曲线,在 36 和 60 h 总多酚含量较对照都有较大幅度的增加。

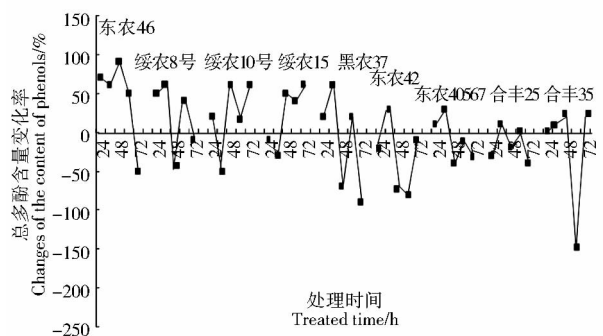


图 1 抗感不同大豆品种用疫霉根腐病菌毒素处理后根中总多酚含量变化率

Fig. 1 Changes of phenols contents in roots of soybean cultivars treated by pathotoxin produced by *P. sojae*

### 2.2 茎总多酚含量变化趋势

从图 2 可以看出,毒素处理后,抗感不同品种茎中总多酚含量变化差异较大。抗性品种绥农 8 号和绥农 10 号茎中总多酚含量在 48 h 后均高于对照,绥农 15 茎中总多酚含量是在处理的前 60 h 均表现高于对照;感性品种东农 40567 和合丰 35 茎中总多

酚含量呈V型变化,总体而言,抗病品种茎中总多酚含量在整个病程中的大部分时期相对于对照增幅较大,而感病品种相反。中感品种黑农37茎中总多酚含量较对照在大部分时期相对增加,但也有部分时期相对降低。

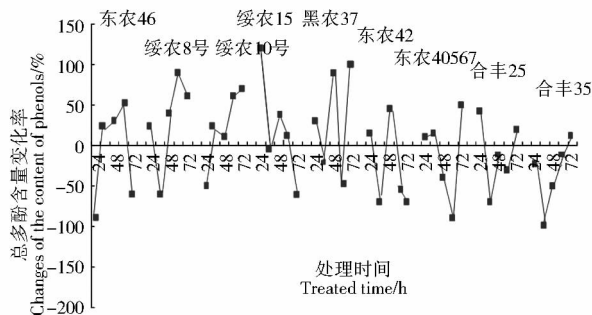


图2 抗感不同大豆品种用疫霉根腐病菌毒素处理大豆茎中总多酚含量变化率

Fig.2 Changes of phenols contents in stems of soybean cultivars treated by pathotoxin produced by *P. sojae*

### 2.3 叶片总多酚含量变化趋势

从图3可以看出,毒素处理后,抗性品种东农46叶中总多酚含量呈双峰变化,绥农10号和绥农15叶中总多酚含量快速升高和快速降低的趋势,并且在48和60h增加相对较多;感性品种合丰35在整个过程中叶中总多酚含量均低于对照,中感品种黑农37叶中总多酚含量变化率在整个病程中呈现缓慢的增加。

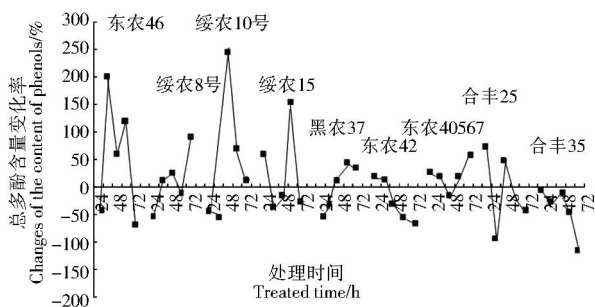


图3 抗感不同大豆品种用疫霉根腐病菌毒素处理后叶中总多酚含量变化率

Fig.3 Changes of phenols contents in leaves of soybean cultivars treated by pathotoxin produced by *P. sojae*

从以上结果可以得出:毒素处理后,抗病品种根、茎、叶中总多酚含量在大部分阶段比对照有所增加,而感病品种相反。中感品种除叶以外,根、茎中总多酚含量变化率趋势基本上是介于抗感品种之间。

## 3 结论与讨论

毒素是具有对寄主植物诱发病害的敏感性诱导因子<sup>[24]</sup>。非寄主专化性毒素在不同浓度时,具有

激发子或抑制子的功能<sup>[25]</sup>。张淑珍<sup>[26]</sup>用稀释50倍即浓度为 $0.1794\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的大豆疫霉根腐病菌毒素处理与本研究相同的大豆材料,不同抗感品种总多酚含量在病程的大部分阶段较对照降低。说明高浓度的毒素在致病过程中主要起着抑制子的功效,而本研究中,采用 $0.0897\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的大豆疫霉根腐病菌毒素处理大豆材料,总多酚含量变化体现了抗感品种之间的差异,说明适宜浓度的毒素在致病过程中主要起着激发子的功效,能诱发植保素的合成。

酚类物质是植物体内重要的次生代谢物,也是重要的植保素之一。Graham等<sup>[27]</sup>用大豆疫霉根腐病菌的细胞壁葡聚糖激发子,处理大豆疫霉根腐病等基因系的离体子叶时,酚类聚合物大量的积累。胡莉莉<sup>[28]</sup>对香蕉假茎接种枯萎病菌后,抗病品种总多酚含量明显增加,感病品种总多酚含量不明显。葛秀秀<sup>[29]</sup>发现抗感不同的大豆品种接种疫霉根腐病菌后,抗病品种根、茎、叶中总多酚类物质含量高于对照,而感病品种较对照降低,后期病菌侵染力较强阶段表现尤为明显。本研究结果表明,抗病品种根、茎和叶中总多酚在病程的大部分阶段与对照相比升高;而感病品种在整个病程中虽然在某些阶段较对照有一定的提高,但幅度不大,在病程其他阶段总多酚下降幅度远大于升高幅度。说明适宜浓度的大豆疫霉菌毒素可以起到激发子作用。

## 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] Anderson T R, Tenuta A. Phytophthora rot [M]//Bailey K L, Gosse B D, Gugel R K, et al. Diseases of field crops in Canada. Saskatoon: Canadian Phytopathological Society, University Extension Press University of Saskatchewan, 2003:155-156.
- [3] Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Races of *Phytophthora sojae* and their virulences on soybean cultivars in Heilongjiang, China [J]. Plant Disease, 2010, 94 (1): 87-91.
- [4] 张淑珍, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 大豆疫霉根腐病菌毒素处理抗感不同大豆品种后苯丙氨酸解氨酶活性的变化 [J]. 作物杂志, 2008 (1): 47-49. (Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Chang of phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) activities among different resistance soybean varieties treated with pathotoxin from *Phytophthora sojae* [J]. Crops, 2008 (1): 47-49.)
- [5] Tsuge T, Nishimura S, Kobayashi H. Metabolic regulation of host-specific toxin production in *Alternaria alternata* pathogens (4) molecular cloning of mRNA in AK-toxin producing isolate [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1986, 52: 690-699.
- [6] 郭霞. 红豆草黑腐病菌毒素的研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009: 4-18. (Guo X. Study on the toxin production by black rot of

- sainfoin [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009: 4-18. )
- [7] 章元寿. 植物病原真菌毒素的研究现状[J]. 真菌学报, 1991, 10(3): 169-181. (Zhang Y S. Research status of the toxins produced by plant pathogenic fungi [J]. Acta Mycologica Sinica, 1991, 10(3): 169-181. )
- [8] 祁高富, 杨斌, 叶建仁. 植物病原真菌毒素研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(2): 66-70. (Qi G f, Yang B, Ye J R. Research advances on the toxin of the plant pathogenic fungus [J]. Journal of Nanjing Forestry University, 2000, 24(2): 66-70. )
- [9] 罗孟军, 朱天辉. 植物病原真菌毒素[J]. 四川林业科技, 2001, 22(3): 45-49. (Luo M J, Zhu T H. Phytotoxin in plant pathogen [J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2001, 22(3): 45-49. )
- [10] 张淑珍, 徐鹏飞, 武小霞, 等. 大豆疫霉根腐病菌毒素的提取及生物活性的测定[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 252-254. (Zhang S Z, Xu P F, Wu X X, et al. Study on extraction and bioactivity assay pathotoxin produced by *Phytophthora sojae* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(3): 252-254. )
- [11] Bhattacharyya M K, Ward E W B. Biosynthesis and metabolism of glyceollin I in soybean hypocotyls following wounding or inoculation with *phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1987, 31: 387-405.
- [12] Ebel J, Grisebach H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperm* f. sp. *glycinea*: A molecular analysis [J]. Trends Biochemical Science, 1988, 13: 23-27.
- [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] Harbone J B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plant [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1999, 27: 335-368.
- [15] 陈兵, 王坤元, 董国强, 等. 水稻纹枯病菌致病性与酶活力的关系[J]. 浙江农业学报, 1992, 4(1): 8-14. (Chen B, Wang K Y, Dong G Q, et al. The correlations in the pathogenicity to the enzymes' activities of *Thanatephorus cucumeris* causing rice sheath blight disease [J]. Acta Agricultural Zhejiangensis, 1992, 4(1): 8-14. )
- [16] 徐兆飞, 刘亚光. 灰斑病菌对大豆叶片总多酚和总黄酮的诱导研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 234-236. (Xu Z F, Liu Y G. Study on induction of total polyphenol and total flavonoid in soybean leaves by *Cercospora Sojina* hara [J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 234-236. )
- [17] 杨辉, 沈火林, 朱鑫, 等. 防御酶活性、木质素和总酚含量与辣椒抗黄萎花叶病毒的关系[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 369-373. (Yang H, Shen H L, Zhu X, et al. A study on the relationship between the resistance to CMV of hot pepper and related defendant enzyme activity, the content of lignins, and total phenols [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(5): 369-373. )
- [18] Yang X B, Ruff R L, Meng X Q. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields [J]. Plant Disease, 1996, 80: 1418-1420.
- [19] 张淑珍, 吴俊江, 葛秀秀, 等. 大豆疫霉根腐病菌产生条件的研究[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 89-90. (Zhang S Z, Wu J J, Ge X X, et al. Study on condition of pathotoxin produced by *Phytophthora sojae* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(1): 89-90. )
- [20] 高必达, 吴畏, 程晖, 等. 麦根长蠕孢毒素对抗病和感病小麦品种叶组织超微结构的影响[J]. 植物病理学报, 1993, 23(2): 107-113. (Gao B D, Wu W, Cheng H, et al. Ultrastructure of leaf tissues of resistant or susceptible wheat exposed to toxin produced by *Lminthosporium sativum* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 32(2): 107-113. )
- [21] 张淑珍, 徐鹏飞, 韩英鹏, 等. 大豆疫霉毒素处理大豆品种后几丁质酶活性的变化[J]. 作物杂志, 2006(3): 17-19. (Zhang S Z, Xu P F, Han Y P, et al. The chitinase activity of soybean varieties after treated with pathotoxin produced from *Phytophthora sojae* [J]. Crops, 2006(3): 17-19. )
- [22] 陈晨, 徐鹏飞, 张淑珍, 等. 大豆疫霉根腐病菌毒素处理不同大豆品种后过氧化物酶活性的变化[J]. 大豆科学, 2010, 29(5): 840-844. (Chen C, Xu P F, Zhang S Z, et al. Changes of peroxidase in soybean treated by pathotoxin produced by *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Science, 2010, 29(5): 840-844. )
- [23] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. (Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999. )
- [24] 陈捷, 蔺瑞明, 高增贵, 等. 玉米弯孢叶斑病菌毒素对寄主防御酶系活性的影响及诱导抗性效应[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 43-48. (Chen J, Lin R M, Gao Z G, et al. The influence of *Curvularia lunata* toxin on defense enzyme activities and its function in the induced resistance of corn [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(1): 43-48. )
- [25] 章元寿. 植物病理生理学 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1994: 50. (Zhang Y S. Plant pathology physiology [M]. Nanjing: Jiangsu S & T Press, 1994: 50. )
- [26] 张淑珍. 大豆疫霉根腐病菌毒素及其诱导抗性机制的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002. (Zhang S Z. Study of pathotoxin produced by *Phytophthora sojae* and induced resistant mechanism of soybean treated by it [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2002. )
- [27] Graham T L, Kim J E, Graham M. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *phytophthora megasperma* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1990, 3(3): 157-166.
- [28] 胡莉莉. 香蕉抗枯萎病生理生化基础的研究 [D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2006: 18-50. (Hu L L. Studies on basic of physiological and biochemical resistance of banana to fusarium wilt [D]. Danzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2006: 18-50. )
- [29] 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: 45-47. (Ge X X. Study on resistance mechanism of soybeans infected by *Phytophthora sojae* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2001: 45-47. )