

野生大豆接种大豆疫霉菌后木质素含量的变化

方东鹏, 靳立梅, 董利东, 姜良宇, 李文滨, 范素杰, 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: 对抗感不同的野生大豆接种疫霉菌后木质素含量的变化进行了研究, 结果表明: 在接种疫霉菌之前, 抗感野生大豆的木质素含量平均值无明显差异; 在接种疫霉菌之后, 抗病野生大豆茎中木质素含量在病程的大部分时期高于对照, 且在病程前期比感病野生大豆增幅大; 在病程的大部分时期, 抗感野生大豆叶中木质素的含量低于对照。

关键词: 大豆疫霉根腐病; 野生大豆; 木质素

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0099

Change of Lignin Content in Wild Soybeans Inoculated with *Phytophthora sojae*

FANG Dong-peng, JIN Li-mei, DONG Li-dong, JIANG Liang-yu, LI Wen-bin, FAN Su-jie, 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 change of lignin content in wild soybeans inoculated with *P. sojae* was studied in this paper. The results showed that there was no significant difference between the resistant and susceptible wild soybeans in the content of the lignin before inoculated with *P. sojae*. The lignin content in stems of resistant wild soybeans increased compared with the control at most of the pathogenicity stages, and the increase rate was also higher than that of susceptible soybean varieties. The lignin content of resistant and susceptible wild soybeans decreased compared with the control at most of the pathogenicity stages in leaves.

Keywords: *Phytophthora sojae*; Wild soybean; Lignin

植物能产生各种各样的与植物抗病性有关的生理活性物质^[1], 木质素就是其中之一。当受到病原菌侵染时, 木质素可以增强寄主细胞壁的结构强度, 而且木质素的前体和产物也可以钝化真菌的膜、酶和毒素^[2]。Chen等^[3]研究发现, 用黑腿病菌接种野生萝卜的子叶、叶片和茎后, 均表现出组织褐变、木质素沉积等很强的抗病特征, 说明木质素参与了抗病反应。杨家书等^[4]在小麦和白粉病菌的相互作用研究中发现, 木质素积累的速度和数量与抗病性呈正相关。骆桂芬等^[5]、宾金华等^[6]研究也发现, 木质素含量的增加, 提高了黄瓜和烟草的抗病性。

大豆疫霉根腐病是一种在整个生育期都严重危害大豆的世界性土传病害, 它是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的^[6-12]。在生产上应用抗性品种是防治该病的最为经济有效的措施^[13], 但由于疫霉菌毒力基因分化复杂, 生理小种变异快, 易导致抗性栽培大豆抗性丧失^[14]。我国有6500余份丰富的野生大豆资源, 而且具有很多优良性状^[15], 所以利用野生大豆资源拓宽栽培大豆的抗性遗传基础, 以提高对大豆疫霉根腐病的抗性是解决该问题的有效途径之一。植物抗病机制十分复杂, 木质素

是其过程中的一个重要物质, 迄今为止, 关于野生大豆抗疫霉根腐病和木质素含量变化相关性的报道几乎没有, 因此, 本研究拟对抗感不同的野生大豆接种疫霉根腐病菌, 分析接种后木质素含量的变化, 进而了解野生大豆的抗性机理, 最终为拓宽我国大豆抗性资源库奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料 野生大豆资源共8份, 由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供。抗病野生大豆: ZYD00388, ZYD00410, ZYD00841, ZYD02405; 感病野生大豆: ZYD00006, ZYD01153, ZYD02497, ZYD02927。分别记为R1, R2, R3, R4, S1, S2, S3, S4。抗感鉴定标准参照Yang等^[16]的方法。

1.1.2 供试病原菌 大豆疫霉根腐病菌1号生理小种(是目前黑龙江省的优势生理小种), 由大豆生物学教育部重点实验室分离鉴定并保存。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 种植方法 野生大豆种子播种前先用机械微

收稿日期: 2014-04-12

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, 2012RFXXN019)。

第一作者简介: 方东鹏(1987-), 男, 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, 博导, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: dnzshzh@163.com。

破种皮,以促进种子的萌发,每个材料分别取6粒种子播种于掺入草炭土的直径为8 cm的盆钵中,播种3盆,重复3次。

1.2.2 菌种的培养 将培养基和培养皿在1个大气压下灭菌20 min后,放置于超净工作台冷却,再将15 mL胡萝卜固体(CA)培养基倒入直径为10 cm的已灭菌的培养皿中,冷却后制成CA固体培养基,然后用接种针将活化的疫霉菌接种于平皿中央,倒置于25℃温箱中培养10 d。

1.2.3 游动孢子悬浮液的制备 参照左豫虎等^[17]的方法略有改动:供试菌株在CA平板上生长6~8 d后,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,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·mL⁻¹游动孢子悬浮液,置室温下保存待用。

1.2.4 接种方法 参照张淑珍等^[18]接种野生大豆方法。采用游动孢子全苗接种法,待野生大豆真叶完全展开后,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,然后将整个植株根部浸没在游动孢子悬浮液中,以蒸馏水为

对照。接种后将处理和对照在25℃保湿箱中保温保湿。

1.2.5 取样方法 接种后0,12,24,36,48,60,72 h连续取样,每次取各供试野生大豆一整株植株,用无菌冰水洗净擦干,分别取根、茎、叶风干后备用。

1.2.6 木质素含量测定及变化率的计算 木质素的测定参照波钦诺克^[19]碘量法,并稍作修改。分别取茎、叶风干样品,粉碎,混合均匀,经分析天平称取0.1 g作为测试样品,每样品重复3次。

$$\text{木质素含量变化率}(\%) = (A_1 - A_0) / A_0 \times 100$$

其中, A_1 —接种后供试野生大豆茎、叶木质素含量; A_0 —未接种野生大豆茎、叶木质素含量。

1.3 数据分析

采用Excel 2003对数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 抗感野生大豆在接种疫霉菌前木质素含量的变化

从表1可以得出:抗感野生大豆在接种疫霉菌之前,茎中木质素含量依次为:S2 > R4 > R2 > R3 > S1 > R1 > S4 > S3。叶中木质素含量从高到低为:R1 > R3 > S1 > S2 > R4 > R2 > S3 > S4。抗感野生大豆茎和叶中木质素含量的平均值比较结果表明,接种前抗感野生大豆茎、叶中木质素含量平均值在0.05水平差异不显著。

表1 接种前抗感野生大豆茎、叶中木质素含量及平均值的比较

Table 1 Lignin content of resistant or susceptible wild soybeans

	R1	R2	R3	R4	S1	S2	S3	S4	抗病平均值 Average of resistance	感病平均值 Average of susceptible
茎 Stem	0.482	0.583	0.551	0.624	0.544	0.812	0.416	0.474	0.680 a	0.546 a
叶 Leaf	0.963	0.552	0.830	0.589	0.673	0.596	0.5444	0.385	0.547 a	0.529 a

2.2 抗感野生大豆接种疫霉菌后木质素含量的变化

从图1可以看到,抗病野生大豆接种疫霉菌后R1、R2、R3茎中木质素含量在病程的大部分阶段明显高于相应对照,而R4在整个病程低于相应对照;在病程的大部分阶段,感病野生大豆S1、S3

木质素含量均高于对照,而S2和S4则低于对照。总体而言,抗病野生大豆(除R4以外)在接种疫霉菌后,茎中木质素含量较对照增加,且在病程的前期(12~36 h),茎中木质素含量较对照的增幅高于感病野生大豆。

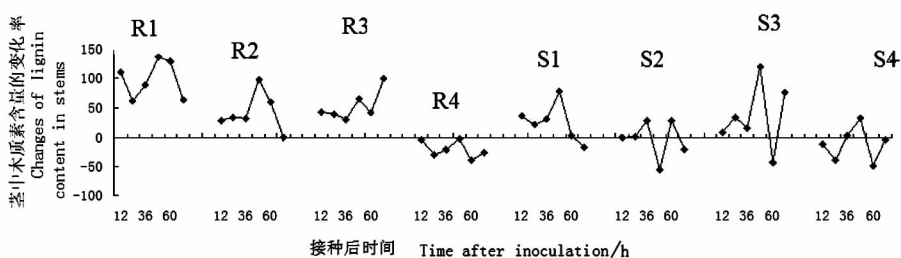


图1 抗感野生大豆在接种疫霉菌后茎中木质素含量的变化

Fig. 1 Changes of lignin content in stems of wild soybeans inoculated with *P. sojae*

抗感野生大豆在接种疫霉根腐病 1 号生理小种后叶中木质素含量的变化如图 2 所示。抗病野生大豆 R1、R2 及感病野生大豆 S2、S3、S4 在病程大部分时期叶中木质素含量低于对照,只有抗病野生大豆

R4 和感病野生大豆 S1 在病程大部分时期木质素含量高于对照。总体而言,接种疫霉菌后,大部分抗感野生大豆在病程大部分时期叶中木质素含量低于对照。

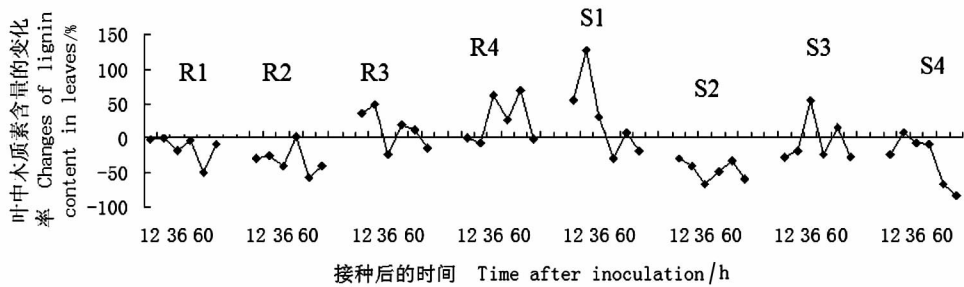


图 2 抗感野生大豆在接种疫霉菌后叶中木质素含量的变化

Fig. 2 Changes of lignin content in leaves of wild soybeans inoculated with *P. sojae*

3 结论与讨论

木质素是植物体内重要的抗菌物质之一,当病原菌侵染时,木质素能够沉积在细胞壁上从而形成结构屏障,加固细胞壁,来抵御病原菌的入侵^[20]。张宪政等^[21]研究指出木质素代谢过程中产生的游离基提高细胞壁的木质化程度也可以钝化真菌细胞,增加寄主植物抵御病原菌的能力,从而起到抗病作用。许勇等^[22]和毛爱军等^[23]在不同植物分别研究发现,木质素含量的增加导致抗病性增强。王海华等^[24]研究表明木质素在细胞壁中的积累可能参与了镍诱导的水稻对白叶枯病系统抗性的建立。本研究表明接种疫霉菌后,抗病野生大豆茎中木质素含量在病程的大部分时期高于对照,且在病程前期的增幅大于感病野生大豆。在病程的大部分时期抗感野生大豆叶中木质素含量低于对照。这说明木质素参与了野生大豆对疫霉菌的抗病反应,尤其是在茎中表现更为明显。张淑珍等^[25]用同样的野生大豆材料为试材接种疫霉菌后,抗病野生大豆 PAL 的活性高于对照,增幅大于感病野生大豆。这进一步说明木质素合成相关酶 PAL 活性增加,可导致木质素含量增加,从而进一步提高野生大豆对疫霉菌的抗性。

Enkerli^[26]用大豆疫霉菌接种不同的抗感栽培大豆品种后,用电镜观察结果表明:在接种大豆疫霉菌后,感病品种在 10 h 之内,寄主细胞皮层没有明显的反应,通过细胞内产生许多吸器,从而形成了一个短暂的活体营养阶段。抗病品种在接种疫霉菌后,几乎没有吸器产生。寄主细胞迅速坏死,4 h 内有大量细胞壁附加物形成,因此病原菌很少能穿过寄主根部内皮层细胞而进入维管束组织。用大豆疫霉菌侵染野生大豆茎部发现^[27-28],抗病野生大豆侵

染后 12 h 疫霉菌附着孢开始进入茎部表皮,而感病野生大豆的附着孢已经完全进入茎部皮层。本研究中大部分抗病野生大豆在接种疫霉菌后木质素的含量较对照增加较快,特别是在接种的前期(接种后 12~36 h)增幅较感病野生大豆增幅大,说明木质素的积累在抗病野生大豆抵御疫霉菌侵染的前期就参与了抗病反应,可能是由于加固了细胞壁或钝化了病原细胞,导致疫霉菌侵染速度减慢,提高了抗病性。

本研究中抗病野生大豆 R4 在接种疫霉菌后茎中木质素含量的变化在整个病程时期均低于对照,而叶中木质素含量的积累要明显大于对照和其他抗感野生大豆,而 R1、R2 与 R4 正好相反,这说明不同的抗病资源的抗性机制可能不同。木质素的变化可能作为抗病性的鉴定指标之一,但在野生大豆抗疫霉根腐病机理中仍需要更多的材料进行佐证,为进一步研究野生大豆抗疫霉根腐病的机理奠定一定的理论基础。

本试验结果表明:在接种疫霉菌前,抗感野生大豆的木质素含量平均值在 0.05 水平无明显差异;在接种疫霉菌之后,抗病野生大豆茎中木质素含量在病程的大部分时期高于对照,且在病程前期比感病野生大豆增幅大。而抗感野生大豆叶中木质素含量在大部分病程期低于对照。

参考文献

- [1] 章元寿,吴畏,高必达,等. 植物病理生理学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1996:215. (Zhang Y S, Wu W, Gao B D, et al. Plant pathophysiology[M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1996:215.)
- [2] 王媛,杨红玉,程在全. SA 诱导拟南芥对灰霉病的抗性与木质素含量的关系[J]. 植物保护,2007,33(4):50-54. (Wang Y, Yang H Y, Cheng Z Q. Relationship between SA-induced resistance to grey mold in *Arabidopsis* and the lignin contents[J]. Plant

- Protection, 2007, 33(4):50-54.)
- [3] Chen C Y, Seguin Swartz G. Reaction of wild crucifers to *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg of crucifers [J]. Canadian Journal of Plant Pathology - revue Canadienne de Phytopathologie, 1999, 21(4):361-367.
- [4] 杨家书, 李舜芳, 薛应龙, 等. 小麦品种对白粉病抗病性与过氧化物酶的关系[J]. 植物病理学报, 1984, 4:235-240. (Yang J S, Li S F, Xue Y L, et al. Varietal resistance of wheat to powdery mildew and its relation to peroxidases [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1984, 4:235-240.)
- [5] 骆桂芬, 崔俊涛, 张莉, 等. 黄瓜叶片中糖和木质素的含量与霜霉病诱导抗性的关系[J]. 植物病理学报, 1997, 35(1):65-69. (Luo G F, Cui J T, Zhang L, et al. Relationship between sugar, lignin content and resistance to downy mildew of cucumber [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1984, 4:235-240.)
- [6] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of phytophthora root rot of soybean [J]. Plant Disease, 1985, 69(4):362-368.
- [7] 张淑珍, 丁广文, 李文斌, 等. 大豆疫霉根腐病研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(6):102-107. (Zhang S Z, Ding G W, Li W B, et al. Progress of research on *Phytophthora sojae* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(6):102-107.)
- [8] 张淑珍. 大豆疫霉才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 on pathotoxin produced by *phytophthora sojae* and induced resistant mechanism of soybean treated by it [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2002.)
- [9] 孙石. 大豆疫霉根腐病抗性的遗传分析及基因定位的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008. (Sun S. Primary study on genetic analysis and gene mapping of resistance to *P. sojae* in soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.)
- [10] 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.)
- [11] 曲娟娟. 大豆疫霉根腐病抗病基因的 RAPD 标记研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001. (Qu J J. Study on the function of RAPD gene related to *Phytophthora sojae* resistance in soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2001.)
- [12] 娄树宝. β -1,3-葡聚糖酶活性与大豆抗疫霉根腐病的关系 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008. (Lou S B. The relationship between activities of β -1,3-glucanase and resistance to *phytophthora* root rot of soybean [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2008.)
- [13] Dorrance A E, McClure S A, Martin S K. Effect of partial resistance on *Phytophthora* stem rot incidence and yield of soybean in Ohio [J]. Plant Disease, 2003, 87:308-312.
- [14] Grau C R, Dorrance A E, Bond J, et al. Fungal diseases [M] // Boerma H R, Specht. Soybeans: Improvement, production, and uses. 3rd ed. Agron. Monogr., no. 16. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, 2004:679-763.
- [15] 齐宁, 林红, 魏淑红, 等. 利用野生大豆资源创新优质抗病大豆新种质 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2):200-203. (Qi H, Lin H, Wei S H, et al. Using wild soybean resources to develop the new soybean germplasm of high quality and diseases resistance [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(2):200-203.)
- [16] Yang X B, Meng X Q, Ruffrl, et al. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields [J]. Plant Disease, 1996, 80:1418-1420.
- [17] 左豫虎, 臧忠婧, 刘锡若. 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 X R. Studies on production condition of zoospores of *Phytophthora sojae* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(3):241-245.)
- [18] 张淑珍, 徐鹏飞, 鹿文成, 等. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后超氧化物歧化酶活性变化 [J]. 作物杂志, 2011(5):31-35. (Zhang S Z, Xu P F, Lu W C, et al. Response of SOD activity in *Glycine soja* inoculated by *Phytophthora sojae* [J]. Crops, 2011(5):31-35.)
- [19] 波钦诺克. 植物生物化学分析方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1981: 178-181. (Peqin Knox. Plant biochemistry analysis [M]. Beijing: Science Press, 1981: 178-181.)
- [20] 于明革, 杨洪强, 翟衡. 植物木质素及其生物学功能 [J]. 山东农业大学学报, 2003, 34(1):124-128. (Yu M G, Yang H Q, Qu H. Lignin and physiological function in plant [J]. Journal of Shandong Agricultural University, 2003, 34(1):124-128.)
- [21] 张宪政, 谭桂茹, 黄元极, 等. 植物生理学实验技术 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989: 99-100. (Zhang X Z, Tan G R, Huang Y J, et al. Plant physiology experimental techniques [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1989: 99-100.)
- [22] 许勇, 王永建, 葛秀春, 等. 枯萎病菌诱导的结构抗性和相关酶活性的变化与西瓜枯萎病抗性的关系 [J]. 果树科学, 2000, 17(2):123-127. (Xu Y, Wang Y J, Ge C X, et al. The Relation between the induced constriction resistance and changes in activities of related enzymes in watermelon seedlings after infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. Journal of Fruit Science, 2000, 17(2):123-127.)
- [23] 毛爱军, 王永建, 冯兰香, 等. 水杨酸诱导辣椒抗疫病生化机制的研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5):219-222. (Mao A J, Wang Y J, Feng L C, et al. Study on the relative biochemical mechanism induced by salicylic acid against *Phytophthora capsici* in pepper [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(5):219-222.)
- [24] 王海华, 谭新中, 彭喜旭, 等. 外质体 H_2O_2 和木质素积累在镍诱导的水稻对白叶枯病系统抗性中的作用 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(5):949-956. (Wang H H, Tan X Z, Peng X X. The role of apoplasmic hydrogen peroxide and lignin accumulation in the systemic resistance of rice to bacterial blight induced by nickel [J]. Scientia Agricultural Sinica, 2010, 43(5):949-956.)
- [25] 张淑珍, 靳立梅, 徐鹏飞, 等. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的变化 [J]. 大豆科学, 2009, 12(6):1044-1048. (Zhang S Z, Jin L M, Xu P F, et al. Response of PAL activity to *Phytophthora sojae* inoculation in *Glycine soja* [J]. Soybean Science, 2009, 12(6):1044-1048.)
- [26] Enkerli K. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycetes *Phytophthora sojae* [J]. Canadian Journal of Botany, 1997, 75(9):1493-1508.
- [27] 靳立梅. 野生大豆对大豆疫霉根腐病抗性机理的初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008. (Jin L M. Preliminary study on resistance mechanism of wild soybeans infected by *Phytophthora sojae* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008.)
- [28] 张淑珍, 吴俊江, 徐鹏飞, 等. 大豆疫霉根腐病菌游动孢子侵袭野生大豆下胚轴的透射电镜观察 [J]. 大豆科学, 2012, 6(31):462-465. (Zhang S Z, Wu J J, Xu P F, et al. Ultrastructure of hypocotyls of *Glycine soja* infected with zoospores of *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Science, 2012, 6(31):462-465.)