

非寄主和寄主种子分泌物对大豆疫霉活性的影响

宋光梅 徐莹 张卓群 陈宇飞 贾梦瑱 文景芝*

(东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为探寻非寄主和寄主种子分泌物中抗病信号分子,通过显微观察,采用菌丝生长速率法和离体接种法对不同种子分泌物处理后大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 的游动孢子数、孢子囊数、游动孢子释放后残留的空囊数、成囊和未成囊的游动孢子数、萌发和未萌发的孢囊数、菌落直径、卵孢子数进行测量,并计算抑制率,明确非寄主菜豆和寄主大豆抗病品种、感病品种种子分泌物对大豆疫霉游动孢子趋化性、生长发育和侵袭力的影响。结果显示,非寄主菜豆种子分泌物不吸引大豆疫霉游动孢子,显著抑制大豆疫霉孢子囊形成、孢囊萌发和卵孢子产生,抑制率依次为 97.3%、73.0% 和 17.5%,然后溶解孢囊,最终导致游动孢子对下胚轴侵袭力降低,抑制率为 67.1%。寄主大豆种子分泌物能吸引大豆疫霉游动孢子,感病品种种子分泌物吸引力高于抗病品种。感病品种种子分泌物对大豆疫霉生长发育无显著影响,但促进大豆疫霉游动孢子侵袭力;抗病品种种子分泌物显著抑制大豆疫霉孢子囊形成、孢囊萌发和卵孢子产生,抑制率依次为 86.6%、34.3% 和 12.8%,然后溶解孢囊,但作用强度小于非寄主菜豆种子分泌物,最终导致游动孢子对下胚轴的侵袭力降低,抑制率为 24.2%。表明非寄主菜豆和寄主大豆抗病品种的种子分泌物对大豆疫霉有抑菌活性,大豆疫霉的非寄主和寄主抗病性与种子分泌物有关。

关键词: 种子分泌物;非寄主抗性;寄主抗性;大豆疫霉;游动孢子趋化性;生长发育;侵袭力

Effects of non-host and host seed exudates on the activity of oomycete pathogen *Phytophthora sojae*

Song Guangmei Xu Ying Zhang Zhuoqun Chen Yufei Jia Mengzhen Wen Jingzhi*

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China)

Abstract: In order to explore disease resistance molecules in the seed exudates of non-hosts and hosts, the number of zoospores, total sporangia, the number of empty sporangia remaining after the release of zoospores, the number of zoospores of encystment and non-encystment, the number of germinated and ungerminated cysts, colony diameter, the number of oospores of *Phytophthora sojae* treated with different seed exudates were observed by using microscopic observation, hyphal growth rate and *in vitro* inoculation methods and the index of inhibition rate was also calculated to determine the effects of seed exudates of the resistant and susceptible cultivars of the non-host common bean and host soybean on the chemotaxis of zoospores, the growth and development and invasiveness of *P. sojae*. The results showed that the seed exudates of non-host common bean did not attract zoospores of *P. sojae*, but inhibited the formation of sporangia, cyst germination and oospores production of *P. sojae* with an inhibition rate of 97.3%, 73.0% and 17.5%, respectively, and lysed cysts, which led to the decrease in the invasiveness of *P. sojae* to hypocotyls by 67.1%. The seed exudates of host soybean could attract zoospores of *P. sojae*, and the attraction of the seed exudates of susceptible cultivars was significantly stronger than that of the

resistant ones. The seed exudates of susceptible cultivars had no significant effect on the growth and development of *P. sojae*, but it promoted the invasiveness of zoospores; the seed exudates of resistant cultivars significantly inhibited the formation of sporangia, cyst germination and oospore production of *P. sojae*, with an inhibition rate of 86.6%, 34.3% and 12.8%, respectively, and lysed cysts, but the intensities were less than those of non-host common bean, which ultimately led to a decrease in the invasiveness of *P. sojae* to hypocotyls by 24.2%. It indicated that the seed exudates of the resistant cultivars of non-host common bean and host soybean had an antibacterial activity against *P. sojae*, and the host and non-host resistance to *P. sojae* were closely related to seed exudates.

Key words: seed exudates; non-host resistance; host resistance; *Phytophthora sojae*; zoospores chemotaxis; growth and development; invasiveness

大豆是中国、亚洲乃至世界各国广泛种植和食用的豆类作物。大豆疫霉根腐病是大豆生产上的一种毁灭性病害,其主要由大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 引起(Tyler, 2007)。为了寻找安全、高效、持久治理大豆疫霉根腐病的有效途径,国内外许多学者都在抗性品种选育、生物防治、农业防治和化学防治等方面进行了大量研究(成蓉等, 2016)。成蓉等(2016)和刘世名等(2016)研究表明选用抗病品种是防治大豆疫霉根腐病最经济有效的措施。寄主大豆与大豆疫霉的关系符合“基因对基因”模型,对于大豆的每个疫霉根腐病抗性基因 *Rps*,在大豆疫霉中均存在与其对应的无毒基因 *Avr*,它们相互作用共同调控大豆疫霉根腐病抗性(Tyler, 2002)。

植物的种子和根可分泌多种物质(刘琳等, 2008;王继元等, 2014),具有生物活性的次生代谢产物调节着种子际和根际微生物种群和数量,同时调节着植物与微生物之间的对话(吴林坤等, 2014),其中的化感物质可介导微生物与植物间的识别,而微生物对种子和根分泌物中特异性信号分子的趋化性是微生物与植物建立关系的关键,如百脉根的根分泌化感物质独脚金萌发素内酯 5-deoxy-strigol 能被菌根真菌识别,共同作用形成菌根(Akiyama et al., 2005);豆科植物根分泌物中的凝集素和黄酮类可吸引土壤中的植物促生细菌,促进植物生长(Rodríguez-Navarro et al., 2007)。对于病原菌而言,寄主抗病、感病品种和非寄主根分泌物对病原菌的作用不同,如黄瓜感病品种根分泌物能刺激尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 菌丝生长,抗病品种根分泌物则显著抑制(王宏乐等, 2010);羽扇豆抗病品种种子分泌物抑制黑曲霉 *Aspergillus niger* 菌丝生长(Scarafoni et al., 2013);辣椒感病品种根分泌物对辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* 菌丝生长、游动孢子囊形成没有显著作用,而抗病品种根分泌物则对其有显

著抑制作用(王继元等, 2014),表明非寄主和寄主抗病品种根分泌物中存在抑菌活性物质,其能抑制病原菌生长发育,抵御病原菌侵染和扩散。

大豆疫霉寄主范围非常有限,在自然界只侵染大豆,而不侵染其它植物(Fawke et al., 2015)。大豆疫霉是典型的土传病原卵菌,当土壤水分充足时其卵孢子萌发形成多核孢子囊,并释放游动孢子(陈秋明等, 2015),游动孢子通过识别寄主种子和根分泌物中的化感物质来定位寄主,在寄主表面形成休止的胞囊,胞囊萌发产生芽管,侵入寄主(Walker & van West, 2007)。武文旭等(2018)研究发现大豆疫霉游动孢子趋向寄主大豆幼根,而对非寄主菜豆不具趋向性,主要原因是寄主根分泌物中的异黄酮介导大豆疫霉与大豆互相识别,导致大豆疫霉根腐病的发生(Morris & Ward, 1992; Hassan & Mathesius, 2012; 文景芝等, 2018a)。由此推测,大豆疫霉侵染前的一系列行为可能与植物种子和根系分泌物有关,不同作物、同种作物不同品种的种子和根系分泌物组分和含量各不相同(刘琳等, 2008;王继元等, 2014)。目前非寄主菜豆,寄主大豆抗病、感病品种种子分泌物对大豆疫霉是否有作用,尚不清楚。

土传病原菌与寄主植物间的识别是由种子和根分泌物介导的(Badri & Vivanco, 2010),大豆疫霉的这种窄寄主范围可能与种子和根分泌物有关。另外,不同品种寄主大豆对大豆疫霉抗病作用和感病作用十分明显,这可能也与种子和根分泌物有关。为此,本试验选取不含任何抗大豆疫霉根腐病基因的大豆感病品种 Sloan、含有抗大豆疫霉根腐病基因 *Rps1k* 的抗病品种 Williams 82、同为豆科植物且为大豆疫霉非寄主的菜豆品种紫花油豆为研究对象,拟通过显微观察,采用菌丝生长速率法和离体接种法对不同种子分泌物处理后大豆疫霉的游动孢子数、孢子囊数、游动孢子释放后残留的空囊数、成囊

和未成囊的游动孢子数、萌发和未萌发的胞囊数、菌落直径、卵孢子数进行测量,计算孢子囊抑制率、游动孢子释放率和释放抑制率、成囊率和成囊促进率、胞囊萌发率和胞囊萌发抑制率、卵孢子抑制率、侵袭力抑制率等指标,明确非寄主菜豆、寄主大豆抗病品种、寄主大豆感病品种种子分泌物对大豆疫霉游动孢子趋化性、生长发育和侵袭力的影响,以期为进一步挖掘和利用寄主和非寄主种子分泌物中的抗病信号分子奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及植物:增强型绿色荧光蛋白标记的大豆疫霉菌株Eps597-3,由本课题组提供。寄主大豆感病品种Sloan,不含任何已知抗大豆疫霉根腐病基因,可被大豆疫霉的任何生理小种感染;寄主大豆抗病品种Williams 82,含有*Rps1k*基因,对供试菌株Eps597-3表现抗病;2个大豆品种种子均由阿肯色大学Dr. Sung M. Lim教授惠赠。非寄主菜豆品种为紫花油豆,为黑龙江省主栽品种,市售。

培养基:胡萝卜琼脂(carrot agar, CA)培养基:胡萝卜200 g、琼脂20 g,离子水定容至1 000 mL。

试剂及仪器:试剂均为国产分析纯。SX-500灭菌锅,上海莱睿科学仪器有限公司;趋化性测定室,自制,将2条高度为3 mm的塑料片粘在洁净的载玻片上,两者相距3 cm,在其上盖盖玻片;塑料片、标准级盖玻片、标准级载玻片,江苏世泰实验器材有限公司;XH-D型涡旋混合器,无锡沃信仪器制造有限公司;NKON-55I型荧光显微镜、NKON-TS100型倒置光学显微镜,尼康映像仪器销售(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子分泌物溶液的制备

分别称取籽粒饱满、颜色正常、大小均匀的供试种子各20 g,75%酒精表面消毒1 min,用无菌去离子水淋洗3次,倒入直径9 cm的无菌培养皿中,加入25 mL无菌去离子水,25℃避光条件下浸泡,1 d后补充无菌去离子水至20 mL,2 d后将种子移出,用孔径0.22 μm细菌滤器过滤含种子分泌物的水溶液,滤液分装于无菌EP管中,-80℃保存,备用。试验时3种种子分泌物溶液浓度均为相对原位浓度的20%。

1.2.2 游动孢子趋化性试验

参照Suo et al.(2016)方法制备游动孢子悬浮液。用直径5 mm打孔器在普通CA平板上打取活

化培养4 d的大豆疫霉菌碟,放入无菌培养皿内,用无菌去离子水浸泡,每30 min换1次水,直到产生大量游动孢子。采用稀释法将其配制成浓度为 2×10^4 个/mL的游动孢子悬浮液。

根据Suo et al.(2016)方法测定游动孢子趋化性,方法略加改动。用移液枪将新鲜游动孢子悬浮液注满趋化性测定室,装置一端分别插入充满不同种子分泌物溶液的毛细管,另一端插入充满等量去离子水的毛细管(空白对照),2支毛细管相距1 cm,插入深度3 mm。15 min后将毛细管取出,用吸水纸将毛细管表面擦净,于100倍倒置光学显微镜下观察并记录毛细管中的游动孢子数量,共观察了10个视野。不同处理各计数20组数据,计算平均数和游动孢子抑制率,游动孢子抑制率=(对照游动孢子平均数-处理游动孢子平均数)/对照游动孢子平均数 $\times$ 100%。试验重复3次。

1.2.3 孢子囊形成及游动孢子释放试验

用直径5 mm打孔器从普通CA平板上打取活化培养4 d的大豆疫霉菌碟10块,放在盛有不同种子分泌物溶液的培养皿内,以等量无菌去离子水为空白对照。25℃恒温避光条件下培养,2 d后于100倍倒置光学显微镜下随机观察,每个菌碟至少观察10个视野,计数不同处理菌碟上产生的孢子囊数量,计算平均数和孢子囊抑制率,孢子囊抑制率=(对照孢子囊平均数-处理孢子囊平均数)/对照孢子囊平均数 $\times$ 100%。试验重复3次。

根据Suo et al.(2016)方法获得产生大量孢子囊的菌碟,将其置于盛有不同种子分泌物溶液的培养皿中,以等量无菌去离子水为空白对照,室温条件下在试验台上静置3 h,于100倍倒置光学显微镜下计数孢子囊总数和游动孢子释放后残留的空囊数,不同处理随机观察10个视野,计算游动孢子释放率和释放抑制率,游动孢子释放率=空孢子囊数/孢子囊总数 $\times$ 100%,释放抑制率=(对照平均游动孢子释放率-处理平均游动孢子释放率)/对照平均游动孢子释放率 $\times$ 100%。试验重复3次。

1.2.4 游动孢子成囊和胞囊萌发试验

在新鲜的游动孢子悬浮液中分别加入3种种子分泌物溶液,以加等量去离子水为空白对照。25℃保持2 h后,于100倍倒置光学显微镜下计数各处理成囊的游动孢子数量和未成囊的游动孢子数量,不同处理各观察10个视野,计算成囊率和成囊抑制率,成囊率=成囊的游动孢子数/游动孢子总数 $\times$ 100%,成囊促进率=(处理平均成囊率-对照平均成

囊率)/对照平均成囊率 $\times 100\%$ 。试验重复3次。

参照 Zhao et al.(2011)方法测定胞囊萌发。将新鲜游动孢子悬浮液在涡旋混合器中振荡90 s以诱导游动孢子休止获得胞囊悬浮液。分别在胞囊悬浮液中加入3种种子分泌物溶液,以加等量去离子水为空白对照。25℃黑暗条件下保持12 h,于100倍倒置光学显微镜下计数各处理萌发胞囊和未萌发胞囊的数量,不同处理各观察10个视野,计算胞囊萌发率和胞囊萌发抑制率,胞囊萌发率=萌发胞囊数/总胞囊数 $\times 100\%$,胞囊萌发抑制率=(对照胞囊平均萌发率-处理胞囊平均萌发率)/对照胞囊平均萌发率 $\times 100\%$ 。试验重复3次。

1.2.5 菌丝生长及卵孢子形成试验

无菌条件下分别将3种种子分泌物溶液加入到融化的CA平板中,混匀倒入直径5 cm的无菌培养皿中,每皿5 mL,以加等量无菌去离子水的CA平板为对照。用直径5 mm的打孔器取普通CA平板上活化培养4 d的大豆疫霉菌碟,菌面朝下放到含不同种子分泌物溶液的CA平板中央,每个平板放1块,25℃避光条件下培养,分别于3 d后观察菌落形态,并采用十字交叉法测量菌落直径。相同条件下继续培养,6 d后用直径5 mm打孔器在菌落半径1 cm处随机打取3个菌碟,在200倍荧光显微镜下记录卵孢子数量,每个菌碟至少观察3个视野,计算平均数和卵孢子抑制率,卵孢子抑制率=(对照卵孢子平均数-处理卵孢子平均数)/对照卵孢子平均数 $\times 100\%$ 。试验重复3次。

1.2.6 游动孢子侵袭力的测定

无菌条件下将大豆感病品种 Sloan 种子点播到花盆中,25℃黑暗条件下培养,出苗5 d后将大豆感病品种 Sloan 黄化苗拔出,用无菌水洗净泥土,用于接种。参照 Chen et al.(2014)方法进行大豆感病品种 Sloan 黄化苗下胚轴伤口接种试验。分别将3种种子分泌物溶液与游动孢子悬浮液按1:4的体积比在1 mL EP管中混合均匀,以加等量无菌去离子水的游动孢子悬浮液为空白对照;15 min后用移液枪分别取4 μL 混合液注射到 Sloan 黄化苗下胚轴3 cm处,不同处理各接种10株,将被接种后的 Sloan 黄花苗平放在铺有湿纱布的接种盘中,于温度25℃、光照16 L:8 D条件下培养。接种2.5 d后测量病斑长度并统计发病率,发病率=发病的黄化苗数/10 $\times 100\%$ 。相同条件下继续培养,4 d后在 Sloan 黄化苗下胚轴接种点各取3块组织,于200倍荧光显微镜下计数下胚轴组织中卵孢子数量,每块组织观察3个

视野并拍照,计算游动孢子侵袭力抑制率,发病率抑制率=(对照发病率-处理发病率)/对照发病率 $\times 100\%$,病斑长度抑制率=(对照病斑长度-处理病斑长度)/对照病斑长度 $\times 100\%$,卵孢子形成抑制率=(对照卵孢子数据-处理卵孢子数)/对照卵孢子数 $\times 100\%$,侵袭力抑制率=(发病率抑制率+卵孢子形成抑制率+病斑长度抑制率)/3 $\times 100\%$ 。试验重复3次。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同种子分泌物对游动孢子趋化性的影响

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理15 min后,吸引大豆疫霉游动孢子的平均数分别为15.2、19.3和20.1个;与对照相比,Williams 82 和 Sloan 种子分泌物均能显著吸引游动孢子($P<0.05$),促进率分别为22.2%和27.2%,而紫花油豆未能显著吸引游动孢子(表1)。

2.2 不同种子分泌物对孢子囊形成及释放的影响

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理6 d后,大豆疫霉孢子囊数分别为1.6、8.0、11.0个,前者显著低于后两者,但后两者差异不显著;与对照相比,3种种子分泌物均显著抑制大豆疫霉孢子囊形成($P<0.05$),孢子囊抑制率分别为97.3%、86.6%和81.6%(表1)。

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理3 h后,游动孢子释放率分别为72.2%、74.5%和76.6%,三者之间差异显著($P<0.05$);与对照相比,紫花油豆、Williams 82 种子分泌物能显著抑制游动孢子释放($P<0.05$),而 Sloan 种子分泌物对游动孢子释放无显著影响(表1)。

2.3 种子分泌物对孢子成囊和胞囊萌发的影响

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理2 h后,游动孢子成囊率分别为86.9%、80.4%和63.6%,三者之间差异显著($P<0.05$);与对照相比,3种种子分泌物均显著促进游动孢子成囊($P<0.05$),成囊促进率依次为408.2%、370.2%和271.0%(表1)。紫花油豆和 Williams 82 种子分泌物处理2 h后,胞囊均出现溶解,溶解数量前者大于后者, Sloan 种子分泌物和对照处理2 h后,胞囊依然完整(图1)。

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理12 h后,胞囊萌发率分别为25.7%、62.6%和94.7%,三者之间差异显著($P<0.05$);与对照相比,

紫花油豆和 Williams 82 种子分泌物显著抑制胞囊萌发 ($P<0.05$), 抑制率分别为 73.0% 和 43.3%, 而 Sloan 种子分泌物对胞囊萌发无显著影响。紫花油豆种子分泌物处理后, 胞囊萌发产生的芽管比 Williams 82、Sloan 种子分泌物和对照处理细(图 1)。

表 1 不同种子分泌物对大豆疫霉游动孢子趋化性和生长发育的影响

Table 1 Effects of different seed exudates on the chemotaxis of zoospore, growth and development of <i>Phytophthora sojae</i>							
种子分泌物 Seed exudate	游动孢子数 No. of zoospores	游动孢子抑制率 Inhibition rate of zoospore (%)	孢子囊数 No. of zoosporangia	孢子囊抑制率 (%) Inhibition rate of zoosporangia	游动孢子释放率 Release rate of zoospore (%)	游动孢子释放抑制率 Inhibition rate of zoospore release (%)	成囊率 Encystment rate (%)
20% 紫花油豆 20% Zihuayoudou	15.2±0.7 b	3.8±0.1 c	1.6±1.7 c	97.3±0.1 a	72.2±0.9 c	6.1±0.1 a	86.9±3.1 a
20% Williams 82	19.3±0.9 a	-22.2±0.1 b	8.0±2.6 b	86.6±0.1 b	74.5±0.5 b	3.1±0.1 b	80.4±0.7 b
20% Sloan	20.1±0.9 a	-27.2±0.1 a	11.0±4.2 b	81.6±0.1 c	76.6±0.8 a	0.4±0.1 c	63.6±0.5 c
对照 CK	15.8±0.8 b	-	59.8±11.8 a	-	76.9±1.0 a	-	17.1±2.1 d

种子分泌物 Seed exudate	成囊促进率 Promotion rate of encystment (%)	萌发率 (%) Germination rate	萌发抑制率 Inhibition rate of germination (%)	菌落直径 Colony diameter (mm)	菌落生长抑制率 (%) Inhibition rate of colony diameter	卵孢子数 No. of oospores	卵孢子抑制率 (%) Inhibition rate of oospore
20% 紫花油豆 20% Zihuayoudou	408.2±0.1 a	25.7±1.7 c	73.0±0.1 a	35.2±0.1 c	8.1±0.1 a	102.2±1.2 b	17.5±0.1 a
20% Williams 82	370.2±0.1 b	62.6±4.5 b	34.3±0.1 b	36.4±0.1 b	5.0±0.1 b	108.1±1.3 b	12.8±0.1 b
20% Sloan	272.0±0.1 c	94.7±1.2 a	0.6±0.1 c	37.4±0.2 ab	2.3±0.1 c	121.0±4.4 a	2.3±0.1 c
对照 CK	-	95.3±0.8 a	-	38.3±0.1 a	-	123.9±1.5 a	-

表中数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

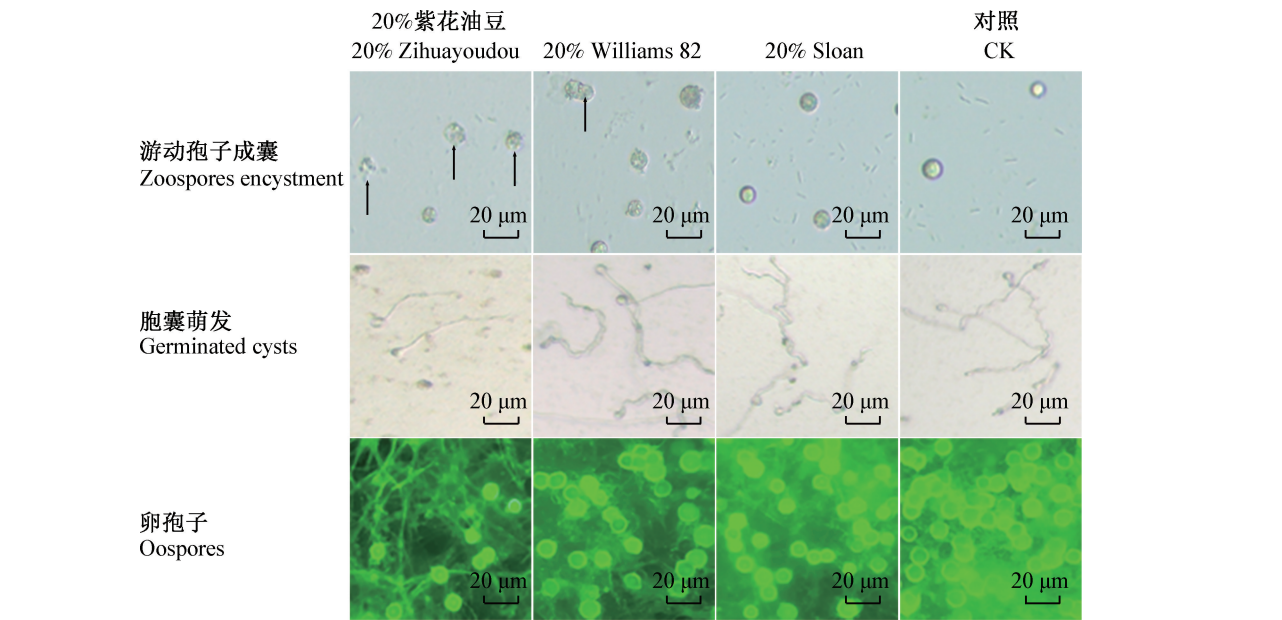


图 1 不同种子分泌物对大豆疫霉生长发育的影响

Fig. 1 Effects of different seed exudates on the growth and development of *Phytophthora sojae*

箭头: 溶解的胞囊。Arrows: lysed cysts.

2.4 种子分泌物对菌丝生长及卵孢子形成的影响

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理 3 d 后,大豆疫霉菌落直径分别为 35.2、36.4 和 37.4 mm;与对照相比,紫花油豆和 Williams 82 种子分泌物显著抑制大豆疫霉菌丝生长($P<0.05$),而 Sloan 种子分泌物抑制作用不显著(表 1)。紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物处理 6 d 后,大豆疫霉的卵孢子数分别为 102.2、108.1 和 121.0 个;与对照相比,紫花油豆和 Williams 82 种子分泌物显著抑制大豆疫霉孢子形成($P<0.05$),抑制率分别为 17.5% 和 12.8%,而 Sloan 种子分泌物对卵孢子形成无显著影响。3 种种子分泌物处理后的卵孢子形态和对照一样均为圆球状(图 1)。

2.5 种子分泌物对游动孢子侵袭力的影响

紫花油豆、Williams 82 和 Sloan 种子分泌物接种大豆感病品种 Sloan 黄化苗下胚轴 2.5 d 后,游动孢子侵袭力抑制率分别为 67.1%、24.2% 和 -0.8%,三者之间差异显著($P<0.05$,表 2),表明紫花油豆、Williams 82 种子分泌物能显著降低游动孢子的侵袭力($P<0.05$),而 Sloan 种子分泌物对游动孢子侵袭力表现出促进作用(表 2)。紫花油豆、Williams 82 种子分泌物处理后 Sloan 黄化苗下胚轴病斑小且扩散受阻(图 2-A),病组织中卵孢子量少(图 2-B);Sloan 种子分泌物和空白对照处理后 Sloan 黄化苗下胚轴病斑长,表皮皱缩(图 2-A);病组织内产生大量卵孢子(图 2-B)。

表 2 不同种子分泌物对大豆疫霉游动孢子侵袭力的影响

Table 2 Effects of different seed exudates on the zoospore invasiveness of *Phytophthora sojae*

种子分泌物 Seed exudate	发病率 Incidence (%)	病斑长度 Lesion length (cm)	卵孢子数 No. of oospores	侵袭力抑制率 Inhibition rate of invasiveness (%)
20% 紫花油豆 20% Zihuayoudou	16.7± 5.8 c	2.4±0.1 c	20.0±1.0 c	67.1±0.3 a
20% Williams 82	76.7±5.8 b	4.8±0.1 b	32.7±2.1 b	24.2±1.2 b
20% Sloan	100.0±0.0 a	5.2±0.1 a	57.3±0.6 a	-0.8±0.4 c
对照 CK	100.0±0.0 a	5.2±0.6 a	56.0±1.0 a	/

表中数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。负号表示促进。
Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test. Negative sign indicates promotion.

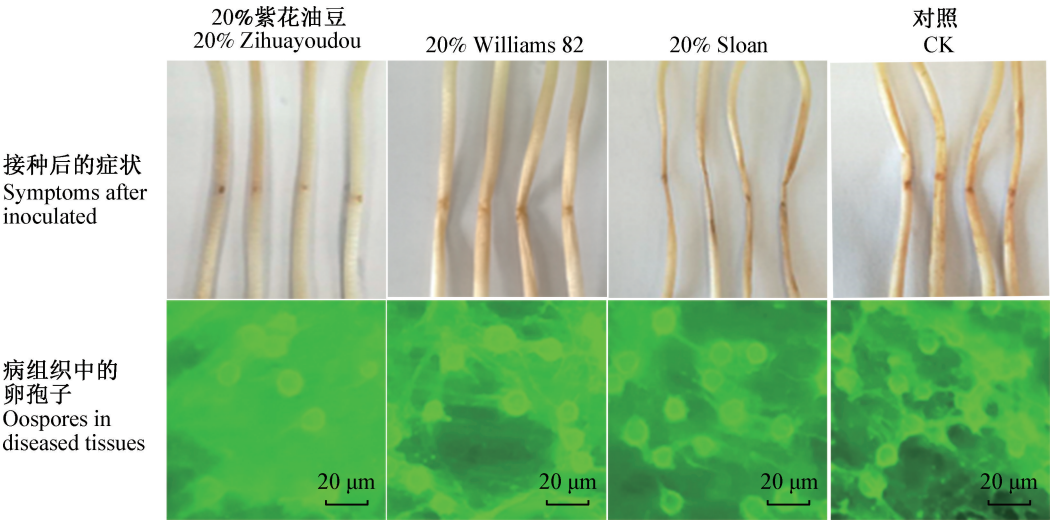


图 2 接种不同种子分泌物 2.5 d 后大豆感病品种 Sloan 下胚轴的症状和病组织中的卵孢子

Fig. 2 Symptoms and oospores in diseased tissues of Sloan hypocotyls inoculated with different seed exudates

3 讨论

本研究结果表明,寄主大豆和非寄主菜豆种子分泌物对大豆疫霉生长发育及游动孢子趋化性、侵

袭力的影响截然不同。寄主大豆种子分泌物能吸引大豆疫霉游动孢子,感病品种种子分泌物对游动孢子的吸引量显著高于抗病品种,与文景芝等(2018b)

研究结论一致,而非寄主菜豆种子分泌物却不吸引大豆疫霉游动孢子,与武文旭等(2018)的非寄主菜豆根系分泌物对大豆疫霉没有趋化作用的结果一致,进一步说明大豆疫霉非寄主抗病性和寄主抗病性大部分是在病原菌侵染前由种子和根分泌物介导的。

本研究发现非寄主菜豆和寄主大豆抗病品种种子分泌物均显著抑制大豆疫霉的菌丝生长、卵孢子和孢子囊形成,能够使大部分大豆疫霉游动孢子在成囊后溶解,减少正常萌发的游动孢子数,降低病原菌的侵袭力,并且非寄主菜豆种子分泌物的抑制作用更强,说明由种子和根分泌物介导的大豆对大豆疫霉寄主抗病性与菜豆对大豆疫霉的非寄主抗病性的机制相同,即寄主大豆抗病品种和非寄主菜豆种子分泌物中含有能够降解菌体细胞壁的酶类或其它抑菌物质,如孜然种子分泌物中的枯茗酸能使辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* 细胞壁主要成分 β -1,3-葡聚糖含量降低,导致细胞壁结构和功能受损进而引起细胞内渗透压紊乱,使胞囊细胞溶解丧失活性,最终导致胞囊萌发受阻(冯俊涛等,2012),这还有待进一步鉴定。

不同作物、同种作物不同品种的种子和根分泌物组分和含量各不相同,王继元等(2014)研究结果表明植物种子和根分泌物与植物抗病性有密切关系,如菜豆抗病品种种子和根分泌物能抑制灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌丝生长,而感病品种种子和根分泌物对其没有影响,其原因与菜豆抗病、感病品种分泌物中酚类物质含量有关(Ei-Gali,2015);张立猛等(2015)研究表明非寄主玉米根分泌物对烟草疫霉菌 *Phytophthora nicotianae* 菌丝生长、游动孢子释放、胞囊萌发均具有明显抑制活性,能溶解胞囊,更重要是玉米根系分泌物中的苯并恶嗪类化合物有抑菌作用。而非寄主菜豆和寄主大豆抗病品种种子分泌物是否也有此类抗菌物质需要进一步鉴定。

种子分泌物种类多样,含量因品种不同也存在差异(刘琳等,2008),因此其对病原菌的作用效果也不同。本研究只对不同种子分泌物对大豆疫霉生长发育以及侵袭力表型的影响进行了初步研究,今后希望从以下2个方面进行深入研究:种子分泌物中特异性信号物质的鉴定;大豆疫霉游动孢子响应种子分泌物中特异性信号物质的分子机制,以期抗病性的应用和生物农药的研发奠定基础。

参 考 文 献 (References)

Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes in-

duce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435: 824–827

Badri DV, Vivanco JM. 2010. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6): 666–681

Chen LL, Shen DY, Sun N, Xu J, Wang W, Dou DL. 2014. *Phytophthora sojae* TatD nuclease positively regulates sporulation and negatively regulates pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interact*, 27(10): 1070–1080

Chen QM, Xiao CX, Sun QQ, Wen JZ. 2015. Overwintering survival rate of *Phytophthora sojae* oospores in soils in Heilongjiang Province. *Journal of Plant Protection*, 42(1): 72–78 (in Chinese)

[陈秋明, 肖彩霞, 孙欠欠, 文景芝. 2015. 大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 卵孢子在黑龙江省土壤中的越冬存活率. *植物保护学报*, 42(1): 72–78]

Cheng R, Dong Z, Li W, Dai LY, Liu SM. 2016. Research progress of soybean root rot. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 32(8): 58–62 (in Chinese) [成瑛, 董铮, 李魏, 戴良英, 刘世名. 2016. 大豆根腐病研究进展. *中国农学通报*, 32(8): 58–62]

Ei-Gali ZI. 2015. Influence of seeds and roots extracts and exudates of bean plant on growth of some pathogenic fungi. *Open Access Library Journal*, 2: e1666

Fawke S, Doumane M, Schornack S. 2015. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3): 263–280

Feng JT, Han LR, Fan RJ, Chen CZ, Zhang X. 2012. Effects of cuminic acid on the growth and development of *Phytophthora capsici* Leonian. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(13): 2628–2635 (in Chinese) [冯俊涛, 韩立荣, 范瑞娟, 陈从珍, 张兴. 2012. 枯茗酸对辣椒疫霉菌生长发育的影响. *中国农业科学*, 45(13): 2628–2635]

Hassan S, Mathesius U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63(9): 3429–3444

Liu L, Liu Y, Qiu FB, Zhang XX, Song W. 2008. Advances of studies on micro-ecology in the spermosphere. *Microbiology*, 35(11): 1811–1816 (in Chinese) [刘琳, 刘洋, 邱服斌, 张晓霞, 宋未. 2008. 植物种子际微生态学研究进展. *微生物学通报*, 35(11): 1811–1816]

Liu SM, Li W, Dai LY. 2016. Progresses in research on the resistance of soybean to *Phytophthora* root rot caused by *Phytophthora sojae*. *Soybean Science*, 35(2): 320–329 (in Chinese) [刘世名, 李魏, 戴良英. 2016. 大豆疫霉根腐病抗性研究进展. *大豆科学*, 35(2): 320–329]

Morris PF, Ward EWB. 1992. Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(1): 17–22

Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruiz-Sáinz JE. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272: 27–136

Scarafoni A, Ronchi A, Prinsi B, Espen L, Assante G, Venturini G, Duranti M. 2013. The proteome of exudates from germinating *Lupi-*

- nus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. *FEBS Journal*, 280(6): 1443–1459
- Suo B, Chen QM, Wu WX, Wu D, Tian M, Jie Y, Zhang B, Wen JZ. 2016. Chemotactic responses of *Phytophthora sojae* zoospores to amino acids and sugars in root exudates. *Journal of General Plant Pathology*, 82(3): 142–148
- Tyler BM. 2002. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 137–167
- Tyler BM. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology*, 8(1): 1–8
- Walker CA, van West P. 2007. Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews*, 21(1): 10–18
- Wang HL, Li SD, Guo RJ. 2010. 7, 8-benzoflavone in root exudates of cucumber and its effect on *Fusarium* wilt occurrence. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(4): 411–418 (in Chinese) [王宏乐, 李世东, 郭荣君. 2010. 黄瓜根分泌物中的7, 8-苯并黄酮及其对枯萎病发生的影响. *植物病理学报*, 40(4): 411–418]
- Wang JY, Lü YY, Yu D, Zhang WN, Piao FZ, Shen SS. 2014. Effects of root exudates from different resistant pepper varieties on *Phytophthora capsici*. *Chinese Vegetables*, (1): 13–16 (in Chinese) [王继元, 吕雅悠, 于迪, 张维娜, 朴凤植, 申顺善. 2014. 不同抗性辣椒品种根系分泌物对疫霉菌的影响. *中国蔬菜*, (1): 13–16]
- Wen JZ, Wu D, Chen YF, Wu WX, Suo B, Gao XY, Zhang ZQ, Xu Y, Song GM. 2018a. Response of *Phytophthora sojae* zoospores to isoflavonoids, amino acids and soluble sugars in root exudates. *Journal of Northeast Agricultural University*, 49(2): 1–10 (in Chinese) [文景芝, 吴迪, 陈宇飞, 武文旭, 所冰, 高新颖, 张卓群, 徐莹, 宋光梅. 2018a. 大豆疫霉对根分泌物中异黄酮、氨基酸和糖的响应. *东北农业大学学报*, 49(2): 1–10]
- Wen JZ, Xu Y, Zhang ZQ, Song GM, Chen YF, Zhao YQ, Jia MZ, Zhu JN. 2018b. Effect of seed exudates of soybean cultivars on developmental behavior of *Phytophthora sojae* and its relationship with disease resistance. *Journal of Northeast Agricultural University*, 49(10): 1–8 (in Chinese) [文景芝, 徐莹, 张卓群, 宋光梅, 陈宇飞, 赵钰琦, 贾梦琪, 朱加楠. 2018b. 大豆种子分泌物对大豆疫霉发育行为的影响及其与品种抗病性关系. *东北农业大学学报*, 49(10): 1–8]
- Wu LK, Lin XM, Lin WY. 2014. Advances and perspective in research on plant-soil-microbe interactions mediated by root exudates. *Journal of Plant Ecology*, 38(3): 298–310 (in Chinese) [吴林坤, 林向民, 林文雄. 2014. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望. *植物生态学报*, 38(3): 298–310]
- Wu WX, Chen QM, Chen YF, Wu D, Gao XY, Zhao YQ, Xu Y, Zhang ZQ, Song GM, Wen JZ. 2018. Response of *Phytophthora sojae* zoospores to the rootlet and root exudates of host soybean and non-host common bean and host selectivity. *Microbiology*, 45(7): 1491–1499 (in Chinese) [武文旭, 陈秋明, 陈宇飞, 吴迪, 高新颖, 赵钰琦, 徐莹, 张卓群, 宋光梅, 文景芝. 2018. 大豆疫霉对寄主大豆和非寄主菜豆根及根分泌物的响应与其对寄主选择性的关系. *微生物学通报*, 45(7): 1491–1499]
- Zhang LM, Fang YT, Ji SG, Jiao YG, Liao JJ, Li JZ, Deng WP, Zhu SS, Yin JW, Yang M. 2015. Inhibitory activity of maize root exudates against *Phytophthora nicotianae* and antifungal compounds analysis. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(1): 115–122 (in Chinese) [张立猛, 方玉婷, 计思贵, 焦永鸽, 廖静静, 李江舟, 邓维平, 朱书生, 尹加文, 杨敏. 2015. 玉米根系分泌物对烟草黑胫病菌的抑制活性及其抑菌物质分析. *中国生物防治学报*, 31(1): 115–122]
- Zhao W, Dong SM, Ye WW, Hua CL, Meijer HJG, Dou XY, Govers F, Wang YC. 2011. Genome-wide identification of *Phytophthora sojae* SNARE genes and functional characterization of the conserved SNARE PsYKT6. *Fungal Genetics and Biology*, 48(3): 241–251

(责任编辑:张俊芳)