

大豆不同花叶病毒抗性品种 胼胝质荧光标记初探

吴思思,李文龙,肖东强,侯春燕,王冬梅

(河北农业大学生命科学学院,保定 071001)

摘要: 选用6个大豆品种与4个不同的大豆花叶病毒株系,分别组成抗病级别不同的组合,通过对接种叶片与上位叶症状观察、苯胺蓝染色辅以荧光显微镜观察和药理学试验,探讨了不同抗病级别组合中胼胝质(即 β -1,3-葡聚糖)积累的特点及其在大豆抵抗大豆花叶病毒侵染过程中的作用。试验结果表明,大豆接种病毒后,在抗病级别分别为0~3的各个组合的叶肉细胞中,在侵染早期(接种后6、72 h)不同的组合在不同时间点分别观察到了胼胝质荧光,且胼胝质荧光出现的时间与抗病级别密切相关,即抗病性越强的组合在侵染点处观察到胼胝质的时间越早;而在抗病级别为5的组合中一直未能观察到胼胝质荧光。另外,在抗病级别为0级和1级的各组合中给叶片预注射2-DDG(2-deoxy-D-glucose,一种胼胝质合成抑制剂)再接种病毒,在上位叶能观察到坏死斑的出现并且通过RT-PCR能够检测到大豆花叶病毒外壳蛋白基因。以上结果表明,大豆被大豆花叶病毒侵染后,抗病性越强的品种就会在侵染点处越早的积累胼胝质,胼胝质的沉积与大豆抗病毒侵染密切相关。

关键词: 大豆;大豆花叶病毒;胼胝质

Callose Fluorescence Labeling and Function in the Different Soybean-soybean Mosaic Virus Combinations

WU Si-si, LI Wen-long, XIAO Dong-qiang, HOU Chun-yan, WANG Dong-mei

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: The selected six varieties of soybean and four different strains of soybean mosaic virus (SMV) are divided into nine combinations that respond to different resistance levels. Through the symptom observation of inoculated leaves and the upper leaves, aniline blue staining followed by fluorescence microscopy, and pharmacological experiment, we wanted to study the characteristics of callose (β -1,3-glucan) accumulation in combinations of different resistance levels and the function of callose in the process of soybean and SMV interaction. The results showed that, in the earlier period of time after inoculation (6-72 h), callose fluorescence in the mesophyll cells of different combinations, which resistance levels ranges from 0 to 3, were observed at different time depending on different resistant levels of combinations and the emergence time of callose fluorescence was closely related to the resistance levels. In another words, the variety was more strongly resisting to SMV and can earlier find the callose fluorescen at the sites of inoculation. However, callose fluorescence had not been observed in the combination that responded in resistance level 5. In addition, in the combinations responding in resistance level 0 and 1, necrosis in the upper leaves was observed and the viral RNA of specific coat protein (CP-RNA) was detected by RT-PCR analysis following pre-injection of 2-DDG (an inhibitor of callose synthesis). Therefore, the deposition of callose at the sites of inoculation could limit the transportation of SMV in mesophyll cells, indicating that callose plays an important role in the resistance of soybean to the infection of SMV. All the results above indicated that, the variety more strongly resisting to SMV can

收稿日期:2012-01-03 修回日期:2012-10-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30971706);河北省自然科学基金项目(C2008000321)

作者简介:吴思思,硕士研究生,研究方向为植物抗逆生理。E-mail:348866396@qq.com

通讯作者:王冬梅,博士,教授,博士生导师,主要从事植物逆境分子细胞生物学领域的研究工作。E-mail:dongmeiwang63@126.com

earlier find the callose accumulation at the sites of inoculation. Callose accumulation related closely to the resistance of soybean to SMV.

Key words: Soybean; Soybean Mosaic Virus; Callose

大豆是一年生豆科植物,是世界上最重要的豆类作物。大豆花叶病毒(*Soybean Mosaic Virus*, SMV)最早由 Clinton 于 1915 年在豆科(*Leguminosae*)大豆(*Glycine max*(L.) Merr.) 中发现,并于 1921 年由 Gardner 和 Kendrick^[1]为之命名,它是世界和我国大豆产区广泛分布且危害严重的病毒病害,严重影响大豆的产量和外观品质。因而引起了国内外科研工作者的重视,并展开了对大豆、菜豆、香蕉、甘蔗及其他植物病毒的广泛研究^[2-5]。

植物病毒侵入寄主细胞后,其局部侵染和系统侵染的形成涉及病毒在植物体内两种不同的转运模式:经过叶肉细胞胞间连丝来实现的胞间转运(cell-to-cell movement)^[6],和经过植物维管系统的韧皮部筛管来实现的长距离运输(long-distance transport)^[7]。有研究表明,病毒侵染抗病寄主后能够引发寄主产生局部过敏反应(Hypersensitive reaction, HR)^[8],并认为 HR 的产生能够阻止病毒的系统侵染^[9-13]。随后的研究发现,胞间连丝的某些修饰作用如胼胝质的沉积会改变胞间连丝对物质运输的通透性,因而会对病毒的细胞间运输产生一定的限制作用^[14-16],也有报道指出胼胝质能够关闭胞间连丝^[17]。其实在早些时候人们就提出病毒侵染抗病寄主时胼胝质沉积在胞间连丝上是 HR 反应的一部分^[9-10]或者说是 HR 的一种特征^[11],但也有研究表明胼胝质的产生早于 HR 坏死斑的出现,胼胝质能够在质膜和细胞壁间沉积^[12]。

胼胝质即 β -1,3 葡聚糖,当植物受到伤害时它能够可逆性的沉积在胞间连丝的颈区细胞壁周围^[18-19],对胞间连丝的通透性有一定的调节作用^[20-21]。因此,胼胝质被认为是一种物理屏障起到限制或阻止病毒在细胞间进行转运的作用。

本实验室前期工作中采用大面积摩擦接种法接种病毒的试验表明,冀豆 7 号与 SMV(大豆花叶病毒)株系 N3 组成的抗病组合其抗病级别为 1 级,在接种后 72 h 接种叶片上出现坏死斑,而在坏死斑出现前后均可在接种叶片上观察到胼胝质荧光;而在冀豆 7 号与 SMV 株系 SC-8 组成的抗病级别为 5 级的感病组合中,坏死斑出现在接种后 96 h,但在坏死斑出现前后在接种叶片上始终未能观察到胼胝质荧光^[22],并通过药物学试验证明了抗病组合中胼胝质

在胞间连丝上的沉积是限制大豆花叶病毒在胞间转运的主要因素。随后,利用嫁接技术将大豆花叶病毒接种到维管束中,探讨了胼胝质在大豆抵抗大豆花叶病毒长距离运输中的作用及其机制,并且证明胼胝质对筛板的修饰是大豆限制 SMV 在维管束中进行长距离运输的主要因素^[23]。这些结果暗示着胼胝质的积累在大豆抗大豆花叶病毒侵染中发挥着重要作用。据此曾设想,在其他大豆品种与不同 SMV 株系组成的不同互作体系中,胼胝质的积累是否为大豆抗 SMV 侵染时表现出的普遍现象,胼胝质的积累程度是否与大豆的抗性级别密切相关。本试验就这些问题开展了大量的研究工作,选用河北省生产上推广的 6 个大豆品种和 4 个 SMV 株系分别组成抗性级别不同的大豆-SMV 组合,通过对接叶片与上位叶症状观察、苯胺蓝染色辅以荧光显微镜观察和药物学试验,探讨了不同抗病级别组合中胼胝质积累的特点及其在大豆抵抗大豆花叶病毒侵染过程中的作用。为进一步明确胼胝质在大豆抵抗大豆花叶病毒侵染中的作用提供可靠依据,为深入探讨大豆抗病毒侵染的分子机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 大豆品种 选用河北省近年来主要种植的大豆品种:冀豆 7 号、冀黄 13 号、NF58、冀豆 15 号、五星 1 号和五星 2 号,由河北省农林科学院粮油作物研究所提供。

1.1.2 病毒毒源 大豆花叶病毒由南京农业大学大豆研究所提供,包括 SC-8、N3、3238 和 SA 共 4 个株系。试验在防虫温室内进行,病毒在感病品种南农 1138-2 上繁殖,其叶片研磨液作为接种病毒用的汁液。

1.2 试验方法

1.2.1 接种和取样 试验在防虫温室中进行,光照为 10000 lx,光照时间为 14 h/d,温度为 25 ℃。采用点接种法^[24]和传统的摩擦接种法接种病毒,其中点接种法用于坏死斑产生前后对胼胝质的荧光观察试验及 2-DDG 注射后再接种病毒对上位叶症状的观察及其 SMV-CP 的扩增试验;摩擦接种法用于对不同组合抗性级别的鉴定。于接种后 0、6、12、24、

48、72 h 等时间点分别取材进行苯胺蓝染色。

抗病组合药物学试验取样:叶片注射 2-DDG 后 16 h 在注射部位通过点接种法接种病毒,并在接种后第 10 天观察上位叶症状并取样,将叶片放入取样袋并迅速投入液氮速冻,然后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于 RNA 提取。以未注射 2-DDG 的植株作为对照。

1.2.2 大豆花叶病毒的抗性分级标准 摩擦接种后,采取南京农业大学濮祖芹等^[25]制定的分级标准,病级按花叶、坏死两种类型各分为 4 级,花叶型分级:0 级:即免疫、无症状或仅在接种叶上出现局部枯斑;1 级:接种叶表现轻花叶;2 级:接种叶表现黄斑花叶、叶片轻度皱缩;3 级:接种叶表现重花叶、叶片皱缩卷曲;4 级:接种叶片严重皱缩且植株矮化。

坏死型分级:0 级:即免疫、无症状或仅在接种叶上出现局部枯斑;1 级:接种叶部分叶片上出现可见微小坏死斑;2 级:接种叶上的多数坏死斑直径在 5 mm 以下或有小叶脉坏死;3 级:接种叶坏死斑连片或坏死叶脉长度在 20 mm 以上;4 级:接种叶片因坏死脱落,或坏死面积超过叶片总面积的 50%,或出现顶枯不能继续生长。

病级调查时,如在同一植株上出现花叶、坏死两种症状,以症状表现级别高的为准。同时结合病情指数将抗性级别分为以下 5 个级别:0 级(高抗):无可见系统症状,病情指数为 0;1 级(抗病):病情指数在 15% 以下;2 级(中感):病情指数 15% ~ 30%;3 级(中感):病情指数在 30% ~ 50% 之间;4 级(感病):病情指数在 50% ~ 65% 之间;5 级(高感):病情指数大于 65%。

病情指数 = (感病株数 × 病级) / (总株数 × 4) × 100%

1.2.3 胍胍质的苯胺蓝荧光标记 胍胍质的苯胺蓝染色参照 Conrath 等^[26]的方法进行。不同时间点取材的大豆叶片在 2 倍乙醇稀释的乳酚油(水:甘油:苯酚:乳酸的质量比为 1:2:2:1)中煮沸 2 min,蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 min,在 0.01% 苯胺蓝(pH7.0 的磷酸缓冲液配制)中染色 15 min,蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 min,然后在 OLYMPUS BX51TR 型荧光显微镜下紫光(波长 385 nm)激发观察并照相。

1.2.4 药物配制及浓度确定 试验选用固体药品 2-DDG,溶于 PBS pH7.0 溶液。2-DDG 的注射浓度以本实验室前期工作为依据,在前期试验中分别选取 0、200、500、1000 $\mu\text{mol/L}$ 4 个浓度进行注射,通过观察药物浓度对大豆生长及病毒侵染后坏死斑出现时间的影响,最终将浓度确定为 500 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.5 叶片注射 将大豆置于日光灯下使气孔处于开放状态,用邓恩新^[27]改进的注射装置的小室扣住 10 ~ 12 日龄大豆幼苗第 1 片叶片两侧脉间部位,将溶液注入小室内,形成一定压力,使溶液通过气孔渗入叶片,溶液在压力作用下,迅速向注射点两端浸润,一般 3 次可将叶片两侧脉间部位注满。

1.2.6 SMV 的 CP 引物设计 参照郭东全^[28]论文。引物由上海生工生物工程有限公司合成,上游引物:5'-ATGCTCAGACAAGTGAGCT-3';下游引物:5'-CTCCCTGCCATTCATAAAC-3'。为了保证 PCR 产物测序的准确性,在 CP 基因的两端各保留了一段序列,因此,扩增目的片段长度为 1050 bp 左右。

1.2.7 叶片总 RNA 提取 按照宝生物公司 RNAisoTM Plus 植物总 RNA 提取试剂的方法进行。阳性对照为感病品种南农 1138-2 的感病叶片;阴性对照为各个抗病组合中未接种的健康叶片。

1.2.8 RT-PCR 检测 采用 10 μl 体系配制反转录体系反应液,其中包括 2 μl MgCl_2 、1 μl 10 × RT Buffer、3.75 μl RNase Free dH_2O 、1 μl dNTP Mixture、0.25 μl RNase Inhibitor、0.5 μl AMV Reverse Transcriptase、0.5 μl Oligo dT-Adaptor Primer、1 μl 总 RNA。反转录条件为:42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,1 个循环。采用 10 μl 体系进行 PCR 扩增,其中包括 1 μl 1 × PCR Buffer、6 μl 灭菌蒸馏水、0.5 μl TaKaRa Ex TaqTM HS、1 μl 上游特异性 PCR 引物、1 μl 下游特异性 PCR 引物、0.5 μl cDNA。将 PCR 反应液加入反转录反应结束后的 PCR 管中,轻轻混匀。扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,之后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、退火温度 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 的程序运行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸反应 10 min。反应结束后取 6 μl 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,其余存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 大豆品种对 4 个 SMV 株系的抗性鉴定结果

将 6 个大豆品种经摩擦接种不同的 SMV 株系后,对不同组合的病情指数和抗性级别进行了调查和鉴定,现将具有代表性的组合列于表 1,其中包括了 0、1、2、3 和 5 等 5 个不同的抗病级别,数字越大表示抗性越弱。对于抗病级别为 0 和 1 的组合因为只有接种叶片表现出少量枯斑,且病情指数为 0 或在 15% 以下,通常称之为抗病组合;而对于抗病级别为 2 以上的组合因为不但在接种叶片上表现出坏死斑或花叶等症状,而在上部未接种叶片上也表现出坏死斑等症状,且病情指数在 15% 以上,通常称之为感病组合。

表 1 不同组合的抗性鉴定结果

Table 1 The identification results of resistance levels in different combinations

不同组合 Different combinations	反应型 Reaction type	发病株/接种数 Incidence/ inoculation	病情指数 (%) Disease index	抗病级别 Resistance level	坏死斑产生时间 The generation time of necrotic spot	胼胝质荧光产生时间 The generation time of callose fluorescence
冀豆 15 号接种 N3	N/0	0/72	0	0	接种后第 4 天	接种后 6 h
五星 2 号接种 N3	N/0	0/54	0	0	接种后第 4 天	接种后 6 h
五星 1 号接种 SA	N/0	0/52	0	0	接种后第 4 天	接种后 6 h
五星 1 号接种 N3	N/0	1/49	5.10	1	接种后第 4 天	接种后 6 h
冀黄 13 号接种 N3	N/M	26/58	22.41	2	接种后第 6 天	接种后 24 h
冀豆 7 号接种 SA	N/M	59/72	20.49	2	接种后第 7 天	接种后 24 h
冀豆 7 号接种 3238	N/M	49/64	38.28	3	接种后第 7 天	接种后 24 h
冀黄 13 号接种 SC-8	N/MN	62/67	92.54	5	接种后第 6 天	无
NF58 号接种 N3	N/MN	58/58	100	5	接种后第 7 天	无

N/0 接种叶局部坏死,上位叶没有症状;N/M 接种叶局部坏死,上位叶花叶;N/MN 接种叶局部坏死,上位叶兼有坏死和花叶

N/0 Local necrosis of inoculation leaves, no symptom of the upper leaves; N/M Local necrosis of inoculation leaves, there are mosaic on the upper leaves;

N/MN Local necrosis of inoculation leaves, there are necrosis and mosaic on the upper leaves

2.2 不同组合在坏死斑产生前后叶片胼胝质的荧光

将表 1 所列品种采用点接种方法接种相应病毒株系,对不同抗病级别的组合在接种病毒后坏死斑出现的时间进行观察发现,抗病级别为 0 或 1 的组合,在接种后 96 h 在接种叶片上出现了坏死斑,而抗病级别为 2、3 和 5 的组合,分别在接种后 144 h 或 168 h 观察到坏死斑。前期工作证明,大豆接种 SMV 组成的感病组合中在接种后 42 h 病毒即可运出接种部位。所以,本试验中分别对不同组合在坏死斑出现前接种部位的胼胝质产生情况进行了观察,同时对不同组合在坏死斑产生后的胼胝质积累情况也进行了观察。试验结果显示,接种后 6、12、24、48、72 h,抗病级别为 0 和 1 级的组合表现出了相似的胼胝质积累规律(图 1),即在接种后 6~72 h 均可在接种部位观察到胼胝质荧光(图 1-A、C、E、G、I),且胼胝质荧光分布在表皮细胞或叶肉细胞的细胞壁上;而在坏死斑出现(接种后 96 h)后,在坏死斑上及其周围细胞上也能观察到大量胼胝质荧光(图 1-K、M、O、Q、S);但在接种后 264 h 在所观察的坏死斑上未能再观察到胼胝质荧光(图 1,U)。对抗病级别为 2 的组合的观察结果表明,在接种后 24~120 h(即坏死斑出现之前)在接种部位可以观察到在表皮细胞上有极少量胼胝质荧光,而在坏死斑出现(接种后 144 h 或 168 h)后,在坏死斑上及其

周围细胞上也能观察到少量胼胝质荧光,在这里给出该组合在坏死斑出现前两个时间点(接种后 6 h 和 24 h,图 2-A、C)、坏死斑出现时(接种后 168 h,图 2-E)和坏死斑出现后(接种后 288 h,图 2-G)的胼胝质标记结果。对抗病级别为 3 的组合的观察结果与抗病级别为 2 的组合类似。对抗病级别为 5 的组合的观察结果表明,无论在坏死斑出现前(图 3-A、C)还是在坏死斑出现后(图 3-E、G),在接种部位一直未能看到胼胝质荧光。值得说明的是,本试验表 1 所列的 9 个组合中抗病级别相近(即在接种叶片坏死斑产生时间和上位叶片的表现症状均相似)的组合其胼胝质产生的时间和消失的时间以及积累的规律均也极其相似。所以为了避免赘述,我们仅以抗病(抗性级别为 0 或 1)、中感(抗性级别为 2 或 3)和高感(抗性级别为 5)3 个代表性组合进行说明。

以上结果表明,抗病级别为 0 或 1 的抗病组合,在互作早期尤其在接种后 6~48 h 能够快速在接种部位积累胼胝质,而对于抗病级别为 5 的高感组合始终观察不到胼胝质的累积,对于那些中感组合即抗病级别表现为 2 和 3 的组合其胼胝质出现的时间较晚且累积量极其微弱,大都在接种后 24 h 出现。所以,大豆对花叶病毒的抵抗与互作早期在接种部位快速积累胼胝质有关,这可能是大豆抵抗花叶病毒侵染的重要因素。

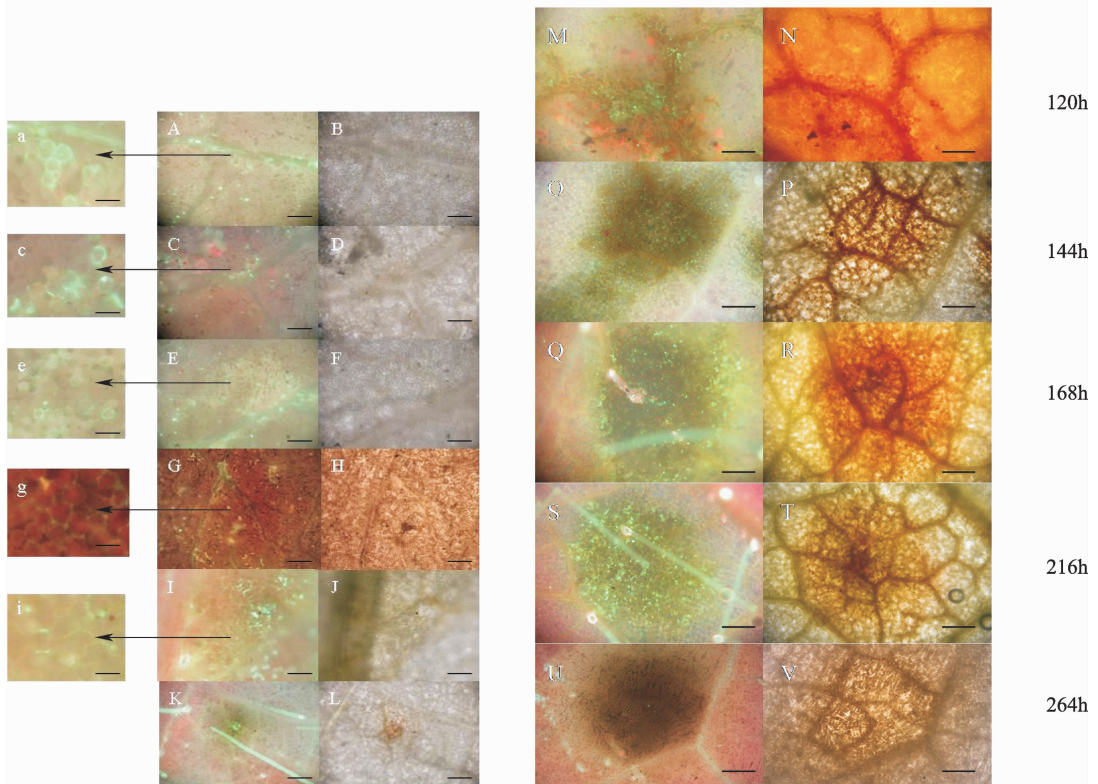


图1 冀豆15号叶片接种N3后细胞壁上(A、C、E、G、I)和坏死斑上及其周围(K、M、Q、S、U)胼胝质荧光观察(抗病级别:0级)
Fig.1 Fluorescence at the inoculation sites in cell walls(A、C、E、G、I) and in and outside the necrotic spot(K、M、Q、S、U) of detected from soybean cv. Jidou 15 leaves inoculated with SMV strain N3 (resistance level:0)

A:接种后6h;B:A的透射光照片;C:接种后12h;D:C的透射光照片;E:接种后24h;F:E的透射光照片;G:接种后48h;H:G的透射光照片;I:接种后72h;J:I的透射光照片;K:接种后96h;L:K的透射光照片;M:接种后120h;N:M的透射光照片;O:接种后144h;P:O的透射光照片;Q:接种后168h;R:Q的透射光照片;S:接种后216h;T:S的透射光照片;U:接种后264h;V:U的透射光照片;a、c、e、g、i分别为A、C、E、G、I图箭头尾部所指区域的局部放大。Scale bar = 5×10^{-3} mm 图A-J; Scale bar = 1×10^{-2} mm, 图K-V; scale bar = 5×10^{-4} mm 图a、c、e、g、i。

A:6 h after inoculation; B: was light micrograph of A; C:12 h after inoculation; D: was light micrograph of C; E:24 h after inoculation; F: was light micrograph of E; G:48 h after inoculation; H: was light micrograph of G; I:72 h after inoculation; J: was light micrograph of I; K:96 h after inoculation; L: was light micrograph of K; M:120 h after inoculation; N: was light micrograph of M; O:144 h after inoculation; P was light micrograph of O; Q:168 h after inoculation; R: was light micrograph of Q; S:216 h after inoculation; T: was light micrograph of S; U:264 h after inoculation; V was light micrograph of U; a、c、e、g、i is separately enlarged picture of the area on the tail of the arrow in picture A、C、E、G、I. Scale bar = 5×10^{-3} mm, A-J; scale bar = 1×10^{-2} mm, K-V; scale bar = 5×10^{-4} mm, a、c、e、g、i。

2.3 抗病组合中叶片预注射2-DDG对病毒侵染的影响

为进一步探讨胼胝质在大豆抗病毒侵染中的作用,对表1中4个抗病组合的叶片预注射500 $\mu\text{mol/L}$ 的2-DDG(抑制胼胝质合成的药物)后16h再进行点接种SMV,一部分叶片用于症状观察,一部分植株的上位叶用于大豆花叶病毒外壳蛋白CP基因的检测。

2.3.1 叶片症状

对4组抗病组合预注射2-DDG后再行点接种

病毒,仍可在接种后相应时间在接种部位观察到坏死斑(图4,A),并且坏死斑出现的时间与未经注射2-DDG的对照植株一致。图4给出了冀豆15号与SMV株系N3组合的观察结果。接种后10d,大部分未接种上位叶上也出现了花叶、坏死斑等症状(图4,B)。这一结果表明,接种叶片经预注射2-DDG后对胼胝质的产生起到了抑制作用,胼胝质的合成受到抑制后使得病毒在接种部位完成胞间转运进而进入韧皮部又完成了长距离运输,导致上位叶片出现了病毒侵染的症状。

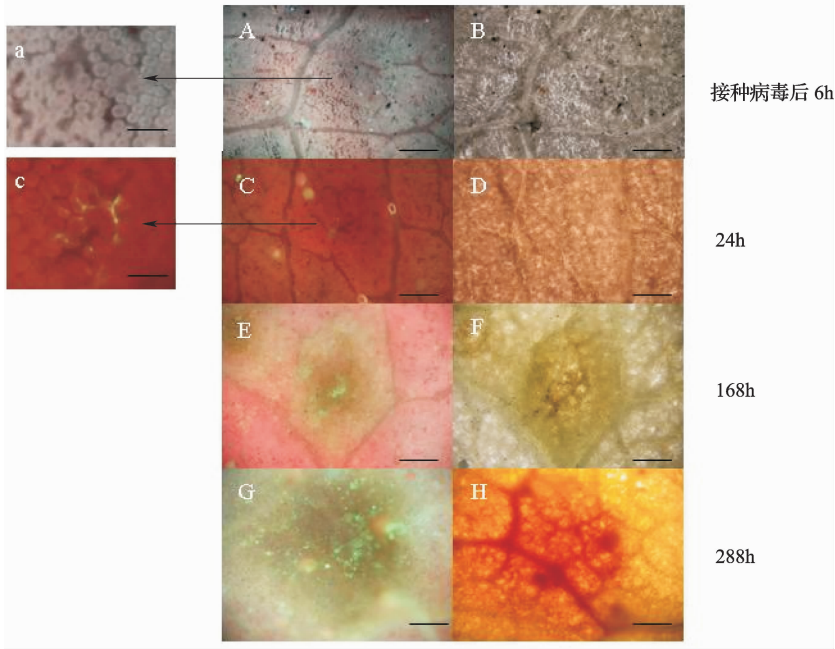


图2 冀豆7号叶片接种SA后细胞壁上(A、C)和坏死斑上及其周围(E、G)胼胝质荧光观察(抗病级别:2级)

Fig. 2 Fluorescence at the inoculation sites in cell walls(A、C) and in and outside the necrotic spot(E、G) of detected from soybean cv. Jidou 7 leaves inoculated with SMV strain SA (resistance level:2)

A:接种后6h;B:A的透射光照片;C:接种后24h;D:C的透射光照片;E:接种后168h;F:E的透射光照片;G:接种后288h;H:G的透射光照片; a、c分别为A、C图箭头尾部所指区域的局部放大。Scale bar = 5×10^{-3} mm 图A-D;Scale bar = 1×10^{-2} mm,图E-H;scale bar = 5×10^{-4} mm 图a、c

A:6 h after inoculation;B:was light micrograph of A;C:24 h after inoculation;D:was light micrograph of C;E:168 h after inoculation; F:was light micrograph of E;G:288 h after inoculation;H:was light micrograph of G;a、c is separately enlarged picture of the area on the tail of the arrow in picture A、C、. Scale bar = 5×10^{-3} mm,A-D;scale bar = 1×10^{-2} mm,E-H;scale bar = 5×10^{-4} mm,a、c.

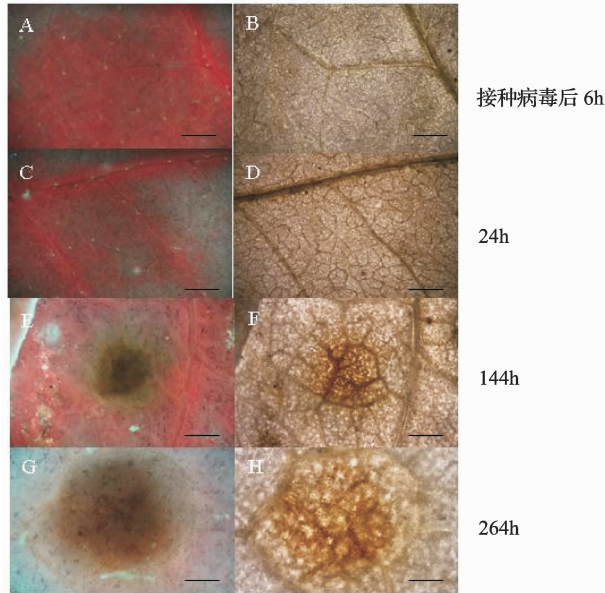


图3 冀黄13叶片接种SC-8后细胞壁上(A、C)和坏死斑上及其周围(E、G)胼胝质荧光观察(抗病级别:5级)

Fig. 3 Callose fluorescence in cell walls(A、C) and in and outside the necrotic spot(E、G) of after Jihuang 13 leaf inoculated with SC-8 (resistance level:5)

A:接种后6h;B:A的透射光照片;C:接种后24h;D:C的透射光照片;E:接种后144h;F:E的透射光照片;G:接种后264h; H:G的透射光照片。Scale bar = 5×10^{-3} mm 图A-D;Scale bar = 1×10^{-2} mm,图E-H。

A:6 h after inoculation;B:was light micrograph of A;C:24 h after inoculation;D:was light micrograph of C;E:n 144 h after inoculation F:was light micrograph of E;G:264 h after inoculation;h:was light micrograph of G. Scale bar = 5×10^{-3} mm,A-D;scale bar = 1×10^{-2} mm,E-H.

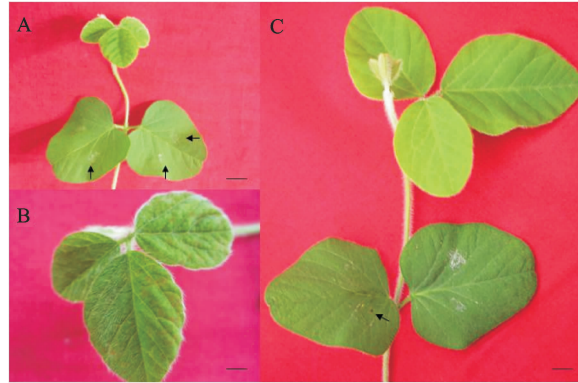


图4 冀豆 15 预注射 2-DDG 后再行点接种 N3 对叶片症状的观察(抗病级别为 0 级)

Fig 4 Symptom of inoculated leaves and upper leaves of Jidou 15 inoculated with N3 after pre-injected with 2-DDG (resistance level: 0)

A: 注射 2-DDG 后再行接种第 7 天的接种叶片症状; B: 注射 2-DDG 后再行接种第 10 天上位叶症状; C: 未经 2-DDG 处理的对照植株。
Scale bar = 1 cm, A; scale bar = 0.5 cm, B, C。

A: Symptom of the inoculated leaves at 7 days injected with DDG prior to the inoculation; B: Symptom of the upper leaves at 10 days after inoculation; C: Symptom of inoculated leaves and upper leaves after inoculated with N3 without pre-injected with 2-DDG. Scale bar = 1 cm, A; scale bar = 0.5 cm, B, C

2.3.2 上位叶中 SMV-CP 基因检测

为进一步确定 2.3.1 结果中上位叶片症状由 SMV 侵染引起, 用 SMV-CP 基因特异性引物进行

PCR 扩增, 1.2% 琼脂糖电泳检测。结果显示, 在 4 个抗病组合的未接种上位叶中均能检测到 SMV-CP 基因的扩增产物(如图 5)。

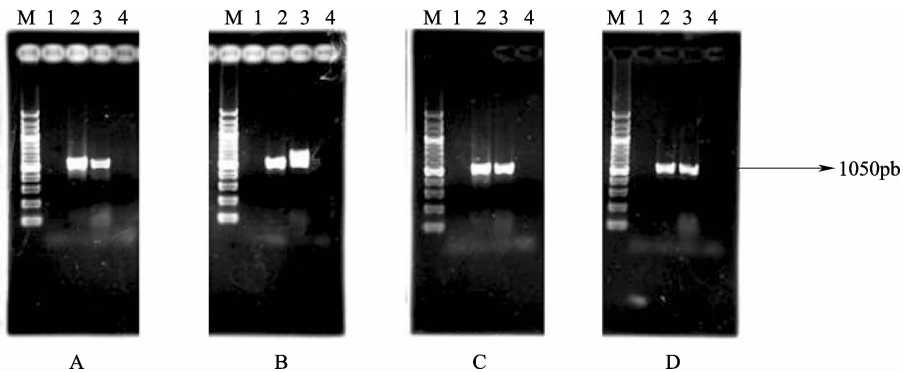


图5 上位叶 SMV-CP 基因的 PCR 检测

Fig 5 PCR results of SMV-CP gene in upper leaves

M: 2000bp DNA marker; 1, 2 分别为阴性、阳性对照; 3: 2-DDG 处理后上位叶 PCR 产物;

4: 未经 2-DDG 处理的上位叶 PCR 产物 A: 冀豆 15 接 N3; B: 五星 2 号接 N3; C: 五星 1 号接 SA; D: 五星 1 号接 N3

M: 2000 bp DNA marker; 1, 2: PCR result of negative control and positive control respectively; 3: PCR result of the upper leaves pre-injected with 2-DDG; 4: PCR result of the upper leaves without pre-injected with 2-DDG A: Jidou 15 leaves inoculated with SMV strain N3;

B: Wuxing 2 leaves inoculated with SMV strain N3; C: Wuxing 1 leaves inoculated with SMV strain SA; D: Wuxing 1 leaves inoculated with SMV strain N3

3 讨论

病毒侵染植物首先通过机械或介体造成的微伤口进入寄主细胞, 然后通过胞间转运进入维管系统, 经韧皮部运输再形成系统侵染^[29-31]。在寄主植物与病毒的互作体系中, 通常在侵染点处会诱导寄主细胞发生过敏反应(HR), 最终导致坏死斑的形

成, 所以人们认为这种细胞死亡与限制病毒运输直接相关^[8]。在大豆与 SMV 互作过程中, 本研究前期工作也证明, 无论是抗病组合还是感病组合寄主被病毒侵染后均在侵染点处产生坏死斑, 进一步研究发现抗病组合中寄主细胞的死亡属于植物细胞的程序性死亡范畴, 即 HR-PCD, 而感病组合中寄主细胞的死亡属于被动死亡^[32]。有许多报道指出, 机械损

伤^[33]、冷冻^[34]、超声波^[35]、高温^[36]、病原菌侵袭^[37]等外界胁迫均可诱导植物细胞合成胼胝质,胼胝质在植物抵抗逆境胁迫中具有重要作用。也有研究表明,病毒侵染寄主植物后,在病毒侵染部位也观察到有胼胝质的产生^[12,29,38-39]。但有人认为胼胝质产生在坏死斑出现之后^[38-39],它伴随着 HR 在限制病毒运输中发挥一定作用;有研究认为胼胝质出现在坏死斑之前^[12],它可作为一种早期物理屏障对病毒的运输起到限制作用。本实验室近期工作证明,大豆品种冀豆 7 号在与 SMV 株系 N3 形成的抗病组合(抗病级别为 1)中,在病毒侵染早期(接种后 6-72 h)即在坏死斑出现前在接种部位可观察到大量胼胝质的积累,而在冀豆 7 号与 SMV 株系 SC-8 形成的感病组合(抗病级别为 5)中,无论在坏死斑形成前还是在坏死斑形成后在侵染部位均观察不到胼胝质,进一步的药理学试验证明,抑制胼胝质的合成后使病毒在原来表现抗病组合的寄主上能够完成系统侵染,并且在病毒侵染处寄主细胞仍然发生 HR-PCD^[22]。据此,曾推测胼胝质在大豆抗花叶病毒侵染中发挥重要作用。本试验筛选了 6 个河北省推广的大豆品种和 4 个不同的 SMV 株系分别组成不同抗性级别的组合(表 1),探讨了不同组合中胼胝质的形成和分布特点,为论证上述推测的正确性提供了可靠试验依据。试验结果表明,在侵染早期(接种后 6-72 h)不同的组合中胼胝质荧光出现的时间与抗病级别密切相关,即品种的抗病性越强在侵染点处观察到胼胝质的时间越早;而在抗病级别为 5 的组合中一直未能观察到胼胝质荧光。为进一步探究胼胝质的作用,试验通过预注射 2-DGG 抑制抗病组合中胼胝质的形成,从而使得病毒能够完成系统侵染,将原本抗病组合转变成了感病组合。这一结果对论证胼胝质在大豆抗花叶病毒侵染中的重要作用提供了有说服力的证据。

本试验中对 SMV 的鉴定主要依据郭东全等^[40]的工作进行的。他们采用 DNASTar 序列分析软件,对 5 个 SMV 分离物的外壳蛋白基因(CP 基因)的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性进行了比较,发现 5 个分离物的 CP 基因之间核苷酸序列同源性为 91.1%~97.1%,推测氨基酸序列同源性为 98.1%~99.2%。之后又与国内外其他 30 个 SMV 分离物进行同源性比较,发现 35 个分离物的 CP 基因的核苷酸序列同源性为 75.3%~100%,据此推导的氨基酸序列同源性为 85.3%~100%,说明 SMV 外壳蛋白基因是一个高度保守的区域。因此

我们用 SMV-CP 基因特异性引物进行 PCR 扩增,就可以说明试验中对抗病组合预注射 2-DDG 后接种病毒,上位叶所表现的花叶和坏死斑等症状的确是由 SMV 侵染引起的。

根据上述研究结果,本课题组目前的工作正着手对胼胝质形成的分子机制及其时空分布特点和作用方式开展深入研究,运用分子生物学技术结合细胞学研究中常用的电子显微技术和免疫组化技术,对胼胝质形成过程中所涉及的 β -1,3-葡聚糖酶和胼胝质合酶在转录水平和翻译水平的表达特征及其时空分布特点、胼胝质积累和病毒侵染的时空变化特征做深入系统的研究,以期对胼胝质在大豆抗病病毒侵染中的作用机制作出合理阐释,这将为生产上培育抗病大豆品种的选育提供理论依据,也将为其他植物抗病毒机制的研究提供启示。

参考文献

- [1] Gardner M W, Kendrick J B. Soybean Mosaic Virus[J]. J Agric Res, 1921, 2(10): 111-114
- [2] 韩俊丽, 郭庆元, 杨知还, 等. 国家种质库保存大豆和菜豆种质的种传病毒检测[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 284-289.
- [3] 曾继吾, 牛玉翠, 黄永红, 等. 利用超低温保存方法脱除香蕉束顶病毒的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(3): 457-460.
- [4] 黄振瑞, 孟岩, 高三基, 等. 甘蔗黄叶病毒外壳蛋白基因原核表达研究[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 7-10
- [5] 黄大辉, 张增艳, 辛志勇, 等. 利用酵母双杂交系统研究植物与病毒蛋白相互作用的进展[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(4): 477-483
- [6] Oparka K J. Getting the message across; how do plant cells exchange macromolecular complexes[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 33-41
- [7] Van Bel A J E. The phloem, a miracle of ingenuity[J]. Plant Cell Environ, 2003, 26: 125-149
- [8] Collinge D B, Slusarenko A J. Plant gene expression in response to pathogens[J]. Plant Mol Biol, 1987, 9: 389-410
- [9] Allison A V, Shalla T A. The ultrastructure of local lesions induced by potato virus X; a sequence of cytological events in the course of infection[J]. Phytopath, 1974, 64: 784-793
- [10] Atabekov J G, Dorokhov Y L. Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses[J]. Adv Virus Res, 1984, 29: 313-364
- [11] Gechev T S, Gadjev I Z, Hille J. An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61: 1185-1197
- [12] Shimomura T, Dijkstra J. The occurrence of callose during the process of local lesion formation[J]. Neth J Plant Pathol, 1975, 81: 107-121
- [13] Stone B A, Clarke A E. Chemistry and Biology of (1-3)- β -D-Glucans[M]. Victoria, Australia: La Trobe University Press, 1992
- [14] Chen X Y, Kim J Y. Callose synthesis in higher plants[J]. Plant Signal Behav, 2009, 4: 489-492
- [15] Epel B L. Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host beta-1,3-glucanases[J]. Semin Cell Dev Biol, 2009,

- 20:1074-1081
- [16] Hofmann J, Youssef-Banora M, de Almeida-Engler J, et al. The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. *Mol J*. *Plant-Microbe Interact*, 2010, 23:549-557
- [17] Robards A W, Lucas W J. Plasmodesmata. *Annu. Rev J*. *Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, 41:369-419
- [18] Roberts A G, Oparka K J. Plasmodesmata and the control of symplastic transport[J]. *Plant Cell Environ*, 2003, 26:103-124
- [19] Radford J E, Vesik M, Overall R L. Callose deposition at plasmodesmata[J]. *Protoplasma*, 1998, 201:30-37
- [20] Northcote D H, Davey R, Lay J. Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells[J]. *Planta*, 1989, 178:353-366
- [21] Delmer D P, Volokita M, Solomon M, et al. A monoclonal antibody recognizes a 65 kDa higher plant membrane polypeptide which undergoes cationdependent association with callose synthase in vitro and colocalizes with site of high callose deposition in vivo [J]. *Protoplasma*, 1993, 176:33-42
- [22] Li W L, Zhao Y S, Liu C J, et al. Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of Soybean mosaic virus[J]. *Plant Cell Rep*. 2012, 31(5):905-916
- [23] 姚贵滨,李文龙,赵永山,等. 嫁接技术在大豆花叶病毒长距离运输机制研究上的应用[J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6):74-79
- [24] 赵永山,李文龙,姚贵滨,等. 一种接种病毒的新方法及应用[A]. //植物生理与分子生物学研究. 北京:科学出版社, 2009, 26-30
- [25] 濮祖芹,曹琦,房德纯. 大豆花叶病毒的株系鉴定[J]. *植物保护学报*, 1982, 9(1):31-36
- [26] Conrath U, Klessig D F, Bachmair A. Tobacco plants perturbed in the ubiquitin-dependent protein degradation system accumulate callose, salicylic acid, and pathogenesis-related protein 1 [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17:876-880
- [27] 邓恩新,王文忠,王智妍. 一种简易的向植物薄叶片内注射溶液的装置[J]. *植物生理学通讯*, 1992, 4:62
- [28] 郭东全. 黄淮中北部大豆花叶病毒的株系鉴定及大豆抗性的遗传研究[D]. 南京:南京农业大学, 2005
- [29] Carrington J C, Kasschau K D, Mahajan S K, et al. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants[J]. *Plant Cell*, 1996, 8:1669-1681
- [30] Gibertson R L, Lucas W J. How do viruses traffic on the vascular highway[J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1:260-268
- [31] Seron K, Haenni A L. Vascular movement of plant viruses[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996, 9:435-442
- [32] 李文龙,王月明,侯春燕,等. 两个不同株系大豆花叶病毒感染大豆细胞的超微病变比较研究[J]. *河北农业大学学报*, 2008, 4:5-10.
- [33] Jaffe M J, Huberman M, Johnson J, et al. Thigmomorphogenesis: the induction of callose formation and ethylene evolution by mechanical perturbation in bean stems[J]. *Physiol Plant*, 1985, 64:271-279
- [34] Majumder S K, Leopold A C. Callose formation in response to low temperature[J]. *Plant Cell Physiol*, 1967, 8:775-778
- [35] Currier H B, Webster D H. Callose formation and subsequent disappearance; studies in ultrasound stimulation[J]. *Plant Physiol*, 1964, 39:843-847
- [36] McNairn R B. Phloem translocation and heat-induced callose formation in field grown *Gossypium hirsutum* L [J]. *Plant Physiol*, 1972, 50:366-370
- [37] Aist J R. Papillae and related wound plugs of plant cells[J]. *Annu Rev Plant Pathol*, 1976, 14:145-163
- [38] Hiruki C, Tu J C. Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in 'Red Kidney' bean[J]. *Phytopathology*, 1972, 62:77-85
- [39] Wu, J H., Blakely L M. Dimitman J E. Inactivation of a host resistance mechanism as an explanation for heat activation of TMV-infected bean leaves[J]. *Virology*, 1969, 37:658-666
- [40] 郭东全,智海剑,王延伟,等. 大豆花叶病毒 5 个分离物的鉴定及外壳蛋白序列分析[J]. *大豆科学*, 2006, 3:18-22