

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.01.010

尖孢镰孢菌侵染后大豆的生理生化指标检测

代颖¹, 杨雅馨¹, 廖鑫¹, 孙霞¹, 王宇霜¹,
武晓玲^{1,2}, 杨文钰^{1,2}, 常小丽^{1,2}

1. 四川农业大学农学院, 成都 611130; 2. 四川省作物带状复合种植工程技术中心, 成都 611130

摘要: 为明确大豆受根腐病致病尖孢镰孢菌侵染后的生理生化反应及其与大豆抗性的关系, 本试验采用带菌高粱粒接种法, 在抗感大豆品种幼苗受尖孢镰孢菌侵染后 0, 7, 15 d 时, 检测根部和地上部组织中过氧化物酶活性(POD)、可溶性糖、丙二醛(MDA)、叶绿素和木质素含量等指标的变化情况。结果表明: 抗病品种和感病品种的可溶性糖和 MDA 相对含量均降低; 但抗病大豆品种的叶绿素相对含量、根部木质素相对含量及 POD 活性明显高于感病品种; 叶绿素、MDA、木质素、POD 与大豆根腐病抗性有关。

关键词: 大豆根腐病; 尖孢镰孢菌; 生理生化指标

中图分类号: S432.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)01-0081-06

大豆镰孢菌根腐病(*Fusarium root rot*)是一种分布范围广, 危害重, 防治困难的世界性土传真菌病害^[1-2]。研究发现, 引起大豆根腐病的镰孢菌种类复杂, 如尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum*、腐皮镰孢菌 *F. solani*、禾谷镰孢菌 *F. graminearum*、木贼镰孢菌 *F. equiseti*、层生镰孢菌 *F. proliferatum*、假禾谷镰孢菌 *F. pseudoproliferatum* 等, 其中尖孢镰孢菌是主要致病菌之一, 在各大豆栽培区普遍发生^[3-5]。课题组前期对四川不同生态区大豆根腐病致病镰孢菌进行分离鉴定发现, 尖孢镰孢菌分离频率高且致病性强^[6-7]。

选育和利用抗病品种仍是防治大豆根腐病最有效的途径。我国虽然大豆资源丰富, 但具有广谱、优质的抗(耐)病大豆品种仍较匮乏。近年来, 东北地区围绕大豆镰孢菌根腐病病原菌种类及抗病种质资源鉴定开展了大量工作, 获得了一批抗性表现良好的大豆品种及资源, 并应用于生产及育种工作中^[1, 8-10]。国内外研究者还对 250 多份大豆材料进行了抗性鉴定, 获得了抗性表现良好的镰孢菌主效数量性状位点(QTL)抗性位点^[11]。但关于镰孢菌侵染后大豆抗病反应的研究尚不足。

病原菌侵染会诱导植物体内一系列生理生化反应, 如过氧化物酶活性(POD)、可溶性糖、丙二醛(MDA)、叶绿素和木质素含量等的动态变化。郑殿峰等^[12]用尖孢镰孢菌侵染大豆根部后测定胚根中总糖含量、可溶性糖含量和 MDA 含量, 认为可溶性糖含量和 MDA 含量可作为抗病育种和药剂调控与保护的研究靶标。张婵娟等^[13]对大豆抗感品种进行菌液处理后测定其幼根内超氧化物歧化酶(SOD)、可溶性糖含量和 MDA 含量, 抗感品种间的 SOD、可溶性糖含量和 MDA 含量变化有明显差异。研究表明植物的抗病反应与氧化物酶活性 POD、可溶性糖、MDA 等有着重要的关系。研究受病原菌侵染后生理生化指标的变

收稿日期: 2019-11-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0101500); 四川省育种攻关项目(16ZC2860)。

作者简介: 代颖, 硕士研究生, 主要从事大豆抗病性研究。

通信作者: 常小丽, 博士, 副教授。

化可为大豆抗病品种选育和鉴定提供一定依据。

本试验以前期已分离鉴定的,引起四川大豆根腐病的致病尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 为病原菌材料,选用根腐病抗性不同的两个大豆品种,测定了尖孢镰孢菌接种后不同时间,大豆不同组织中过氧化物酶活性、可溶性糖、丙二醛、叶绿素和木质素含量等生理生化指标的变化情况,并研究其与大豆根腐病抗性的关系,为大豆根腐病抗病材料筛选与评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试品种:南豆 12 和九月黄,均由四川农业大学农学院作物遗传育种实验室提供。

供试菌株:尖孢镰孢菌菌株 *Fusarium oxysporum* (Fo_Yaan06),由四川农业大学植物病理系前期分离鉴定,并保存在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上备用。

1.2 方法

1.2.1 大豆催芽与接种方法

挑选健康大豆种子,依次用 1% NaClO 溶液处理 2 min,75% 酒精处理 1 min,无菌水冲洗 5~6 次,放于装有灭菌蛭石的托盘中保湿催芽 1 d,待用。病原菌接种参照 Chang 等^[6]的带菌高粱粒接种法进行,放置于恒温培养箱中,(25±3)℃,16 h 光培养/8 h 暗培养,于 V1 期即真叶完全展开,第一片复叶叶缘分离时,约 15 d 左右,进行发病情况调查。在接种后 7 d 和 15 d 收集大豆根组织为地下部分样品不同时间取样(7 d-SR 和 15 d-SR)、茎和叶部为地上部分(7 d-SL 和 15 d-SL),以生长 7 d 和 15 d 的未接种大豆地下部分(7 d-CSR 和 15 d-CSR)、地上部分茎和叶部(7 d-CSL 和 15 d-CSL)为对照。每个处理 3 次重复,每个重复 9 株大豆幼苗用于生理生化指标测定,试验重复 3 次。

1.2.2 病情调查及评级

大豆根腐病的病害分级标准参照王春玲等^[8,14]的方法,计算发病率(M)及病情指数(Id)。大豆抗性类型参照杨帅^[10]的方法分为 5 种:免疫(I),Id 为 0;高抗(HR), $0 < Id \leq 20$;抗病(R), $20 < Id \leq 50$;感病(S), $50 < Id \leq 80$;高感(HS), $Id > 80$ 。

1.2.3 生理生化指标测定

于接种后不同时间,取大豆第一复叶叶片,剪成长、宽均为 0.2~0.3 cm 的叶段,测定各指标含量。叶绿素含量(mg/g)采用分光光度法测定^[15-16];可溶性糖含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)和丙二醛含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)采用硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)法测定^[16];木质素含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)采用紫外分光光度法测定^[15-16]。过氧化物酶(POD)活性测定:参照过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)说明书进行提取,并用紫外分光光度计测定 A470 下的吸光值,计算 POD 活性(U/g)。

1.2.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据整理与计算,采用 SPSS 2.0 软件进行差异统计学意义分析(统计学意义水平 0.05)。叶绿素含量、可溶性糖含量、MDA 含量和木质素含量均为相对含量,即同一时间接种处理与未接种对照的含量比值($\times 100\%$)。POD 的相对活性以同一时间接种处理与未接种对照比值($\times 100\%$)计算。

2 结果与分析

2.1 受尖孢镰孢菌侵染后两个大豆品种根腐病的发生情况

接种尖孢镰孢菌 15 d 后大豆根腐病发生情况调查结果如表 1 所示。南豆 12 和九月黄的发病率均为 100%,但南豆 12 幼苗叶片正常,根部主根轻微变褐或变黑,但能通过侵染点继续生长,须根生长点变褐;而九月黄幼苗叶片发黄,较南豆 12 植株矮小,根部主根严重变黑,不能通过侵染点继续生长,须根明显减少,根部腐烂严重。依据杨帅^[10]的抗性鉴定标准,南豆 12 为抗病品种,九月黄为感病品种。

表 1 大豆根腐病病情及抗病类型

品种名称	发病率/%	病情指数	抗病类型
南豆 12	100.00	31.73	R
九月黄	100.00	61.11	S

2.2 受尖孢镰孢菌侵染后两个大豆品种叶绿素含量的变化情况

接种后测定两个大豆品种叶片的叶绿素含量, 结果如图 1 所示. 接种 7 d 时, 九月黄的叶绿素相对含量显著高于南豆 12; 而 15 d 时, 南豆 12 叶绿素相对含量则显著高于九月黄. 受尖孢镰孢菌侵染后南豆 12 叶片的叶绿素相对含量显著增加, 而九月黄的叶绿素相对含量则显著减少. 结果表明抗病品种受病原菌侵染影响小, 可以正常生长; 而感病品种的叶绿素减少, 可能与病菌侵染后严重影响植株生长有关.

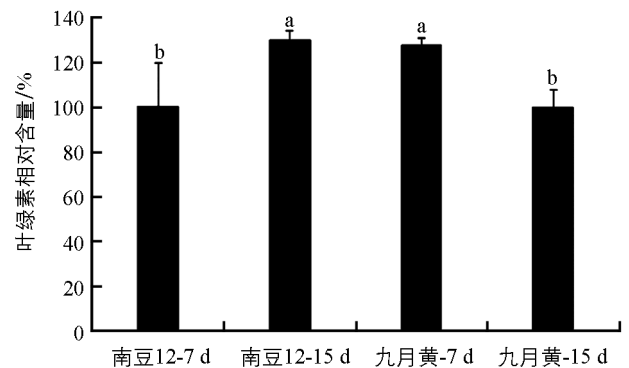


图 1 尖孢镰孢菌接种后 7 d 和 15 d 大豆叶片的叶绿素相对含量

2.3 受尖孢镰孢菌侵染后两个大豆品种可溶性糖含量的变化情况

如图 2 所示, 接种尖孢镰孢菌后 7 d 和 15 d 时, 大豆不同组织部位的可溶性糖相对含量变化不同. 南豆 12 号地上部分(SL)的可溶性糖相对含量差异不具有统计学意义, 地下部分(SR)的可溶性糖相对含量显著减少; 而九月黄则地上部分可溶性糖显著减少, 而地下部分差异不具有统计学意义. 在接种 7 d 时, 九月黄地上部分的可溶性糖相对含量显著多于南豆 12, 南豆 12 号地下部分显著多于九月黄; 而在 15 d 时, 两个品种的地上和地下部分差异均不具有统计学意义. 结果表明在病原菌侵染前期, 抗病品种的根部可溶性糖含量高, 有利于增加抗性, 而在后期病原菌积累量增加, 导致抗病与感病品种无差异.

2.4 丙二醛(MDA)含量的变化情况

如图 3 所示, 接种后 7 d 和 15 d 时同一大豆品种不同组织中 MDA 相对含量变化不同. 南豆 12 地上部分(SL)的 MDA 相对含量差异不具有统计学意义, 而地下根部 MDA 相对含量显著降低; 九月黄则地上部分和地下部分均明显降低. 接种 7 d 时, 两个品种地上部分 MDA 相对含量差异不具有统计学意义, 而地下部分九月黄显著低于南豆 12; 在 15 d 时, 南豆 12 地上部分 MDA 相对含量显著高于九月黄, 而地下部分则差异不具有统计学意义. 结果表明在病原菌侵染前期, 抗病品种地下根部的 MDA 相对含量高于感病品种, 表现出更强的抗性, 而在侵染后期, 伴随病原菌的大量增加, 两个品种的 MDA 相对含量均受到影响.

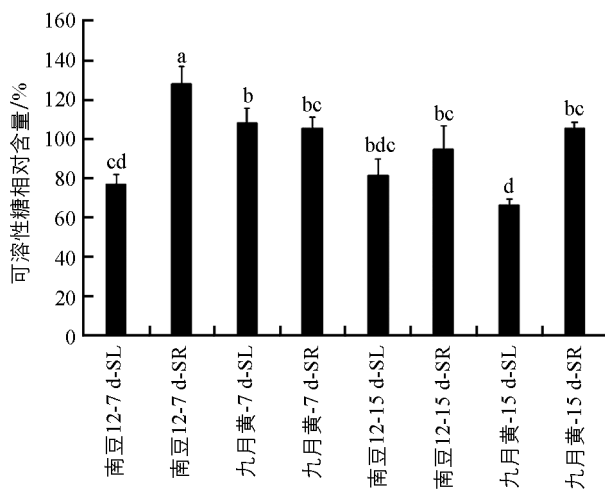


图 2 尖孢镰孢菌接种后 7 d 和 15 d 大豆不同组织的可溶性糖相对含量

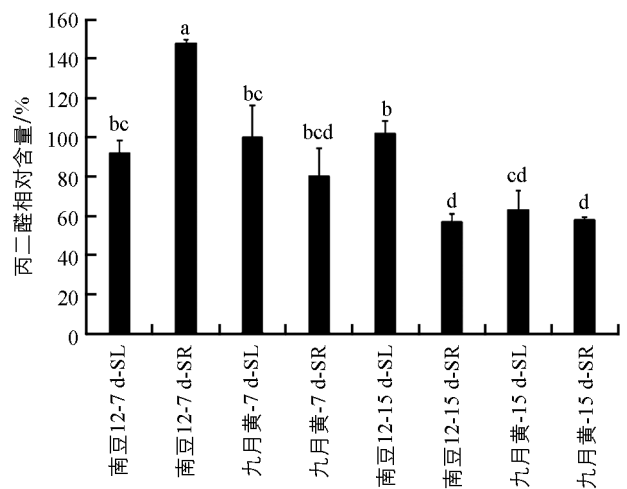


图 3 尖孢镰孢菌接种后 7 d 和 15 d 大豆不同组织的丙二醛相对含量

2.5 木质素含量的变化情况

由图 4 可见,在接种尖孢镰孢菌后 7 d 和 15 d 时,南豆 12 地上部分和地下部分的木质素相对含量变化差异均不具有统计学意义;九月黄地上部分差异不具有统计学意义,而地下部分差异具有统计学意义.接种后同一时间,两个品种地上部分的木质素相对含量差异均不具有统计学意义,而南豆 12 地下部分显著高于九月黄.结果表明抗病品种和感病品种根部木质素相对含量差异明显,抗病品种通过增加根部木质素含量以抵抗病原菌的侵入.

2.6 过氧化物酶(POD)活性的变化情况

由图 5 可见,在接种尖孢镰孢菌后的 7 d 和 15 d 时,南豆 12 地上部分 POD 相对活性均显著增加;地下部分 POD 相对活性差异不具有统计学意义;九月黄则地上部分和地下部分 POD 活性差异均不具有统计学意义.在接种 7 d 时,南豆 12 地上部分 POD 活性显著低于九月黄,地下部分 POD 活性显著高于九月黄;而在 15 d 时,南豆 12 地上部分和地下部分的 POD 活性均显著高于九月黄.结果表明在病原菌侵染过程中,品种的抗病性与 POD 活性有关.

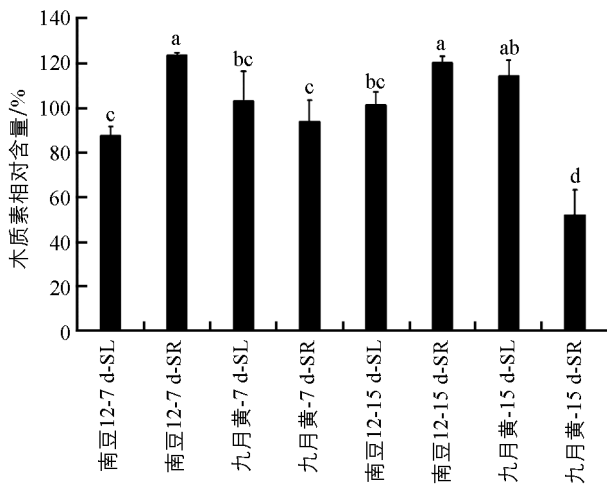


图 4 尖孢镰孢菌接种后 7 d 和 15 d 大豆不同组织的木质素相对含量

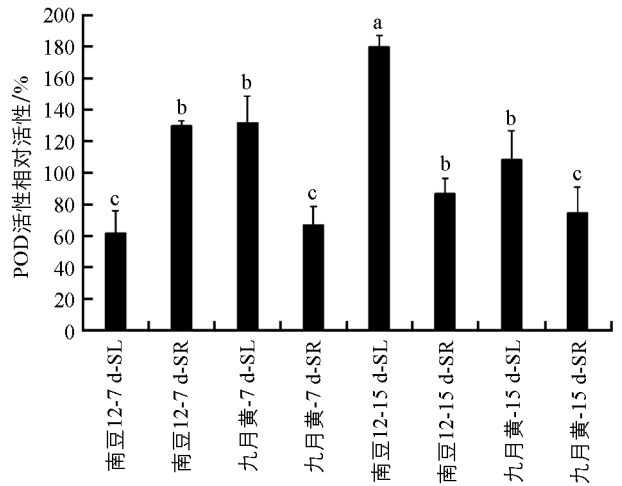


图 5 尖孢镰孢菌接种后 7 d 和 15 d 大豆不同组织的过氧化物酶(POD)相对活性测定

3 结 语

本试验以两个大豆根腐病抗性差异的品种南豆 12 和九月黄为材料,通过高粱粒接种测定了其地上茎叶组织和地下根部的叶绿素、可溶性糖、MDA、木质素含量和 POD 活性.结果发现:抗性品种的叶绿素相对含量受根腐病尖孢镰孢菌侵染后增加,而感病品种则降低,且抗性品种的叶绿素相对含量在侵染后期显著高于感病品种,这与欧志远^[17]关于葡萄叶片内叶绿素的含量与霜霉病的抗性呈正相关相一致.受病原菌侵染后,抗感品种可溶性糖含量均减少,但感病品种减少幅度更大,表明病原菌侵染后大豆呼吸作用增强,与张婵娟等^[13]的研究结果一致.MDA 是膜脂过氧化的产物,病原菌侵入时需要突破细胞膜的屏障,而 MDA 的产生能对细胞膜造成伤害,加速病原菌入侵^[18],导致抗性减弱.在本试验中,抗病品种和感病品种均以减少 MDA 含量来抑制病原菌的侵染,但在病原菌侵染前期,感病品种根部的 MDA 相对含量多于抗病品种,而在后期差异却不具有统计学意义,这与郑磊等^[19]发现的在接种病原菌后,MDA 含量的增长速度 and 积累量决定植株抗病能力的结论相似.木质素存在于植物的木质部中,可以增强植物体的机械强度,同时由于其疏水的化学特性,能使植物免受病原菌的侵害和扩展.本研究中随着接种时间的推移,抗病品种的木质素相对含量变化不明显但感病品种显著减少,这与魏丽娟^[20]关于木质素在抗病和抗倒伏过程中起着重要作用的研究结果相似.同时,抗病品种地下根部的木质素含量显著高于感病品种,而茎和叶中的含量差异不大,推测可能与病原菌侵染及植株发病部位在根部,对地上部分影响较小有关.POD 是一

种关键的活性氧清除酶类, 能保护膜结构, 使植物具有一定的抗病性. 本研究发现抗病性品种地上部分和地下部分的 POD 活性均明显高于感病性品种, 与房玉林等^[21]关于葡萄品种间的抗病性与 POD 活性关系的研究结果相似.

本试验以大豆根腐病的强致病菌尖孢镰孢菌为病原菌材料, 研究大豆不同生理生化指标的变化, 但田间引起大豆根腐病的镰孢菌种类复杂, 后续将进一步鉴定不同大豆品种对多种根腐病致病菌的抗性, 从而获得多抗大豆品种. 不同大豆品种抗根腐病性能还与基因型有关, 除生理生化指标外, 将来可从分子生物学方面对抗病基因进行基因定位来探索其分子抗病机制^[22], 建立基于多个指标综合分析的大豆根腐病抗病性鉴定及评价方法^[23].

本研究结果表明受根腐病致病尖孢镰孢菌侵染后, 抗感病大豆品种的叶绿素含量、可溶性糖含量、丙二醛含量、木质素含量和 POD 活性变化存在差异, 其中叶绿素、丙二醛、木质素、POD 与品种抗性关系密切, 可作为大豆根腐病品种抗性评价的重要指标及抗病育种的研究靶标.

参考文献:

- [1] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病致病病原种类分布及抗病种质鉴定 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 230-235.
- [2] ARIAS M M, LEANDRO L F, MUNKVOLD G P, et al. Aggressiveness of *Fusarium* Species and Impact of Root Infection on Growth and Yield of Soybeans [J]. *Phytopathology*, 2013, 103(8): 822-832.
- [3] 白丽艳, 张全党, 李 斌, 等. 新疆阿勒泰地区大豆镰刀菌根腐病病原鉴定及致病性测定 [J]. 新疆农业科学, 2009, 46(3): 543-548.
- [4] 邢 安, 文景芝, 吕国忠, 等. 黑龙江省大豆根腐病株上镰孢菌的分离与鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(8): 5-9.
- [5] 王晓艳, 文景芝. 东北三省大豆根腐镰孢菌种类及其致病力分析 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(4): 391-395.
- [6] CHANG X L, DAI H, WANG D P, et al. Identification of *Fusarium* Species Associated with Soybean Root rot in Sichuan Province, China [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 151(3): 563-577.
- [7] 何宛芹, 付 瑶, 鲁雯璐, 等. 大豆根腐病致病镰孢菌的多重 PCR 检测技术 [J]. 植物保护学报, 2017, 44(4): 609-616.
- [8] 王春玲. 48 个大豆品种对 3 种根腐镰孢抗性鉴定及遗传多样性的分析 [D]. 沈阳: 东北农业大学, 2016.
- [9] 张 丽, 耿肖兵, 王春玲, 等. 黑龙江省大豆镰孢根腐病菌鉴定及致病力分析 [J]. 植物保护, 2014, 40(3): 165-168.
- [10] 杨 帅. 大豆镰刀菌根腐病病原种类及大豆抗病种质资源筛选 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [11] ACHARYA B, LEE S, ROUF MIAM M A, et al. Identification and Mapping of Quantitative Trait Loci (QTL) Confering Resistance to *Fusarium* Graminearum from Soybean PI 567301B [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128: 827-838.
- [12] 郑殿峰, 梁喜龙, 左豫虎, 等. 大豆根腐病菌对大豆幼苗生理生化指标的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(3): 57-61.
- [13] 张婵娟, 廖胜泉, 宋 欢, 等. 大豆种质资源对尖孢镰孢菌根腐病的抗性鉴定及生理分析 [J]. 大豆科学, 2017, 36(3): 441-446.
- [14] 王春玲, 耿肖兵, 黄铭慧, 等. 一种引起大豆根腐病的尖孢镰孢致病性苗期鉴定方法 [J]. 东北农业科学, 2015, 40(3): 69-72.
- [15] 熊庆娥. 植物生理学实验教程 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2003.
- [16] 朱登峰. 甘蓝型油菜中表达 AtGA2ox8 的表型分析及其对木质素生物合成的影响 [D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [17] 欧志远. 叶绿素含量与植物抗病性的关系 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(6): 134-135.
- [18] RESENDE R S, RODRIGUES F Á, CAVATTE P C, et al. Leaf Gas Exchange and Oxidative Stress in Sorghum Plants Supplied with Silicon and Infected by *Colletotrichum sublineolum* [J]. *Phytopathology*, 2012, 102(9): 892-898.
- [19] 郑 磊, 张 静, 麻文建, 等. 腐皮镰孢菌对不同品种核桃抗性生理指标的影响 [J]. 广西植物, 2016, 36(6): 651-657.
- [20] 魏丽娟. 甘蓝型油菜茎秆木质素与抗性性状的相关性研究及全基因组关联分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.

- [21] 房玉林, 宋士任, 张艳芳. 不同品种葡萄抗霜霉病特性与叶片 POD、PPO 活性关系的研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 392-395.
- [21] 孙聚涛. 大豆疫霉根腐病抗源筛选及抗性基因定位 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [22] 唐庆华, 崔林开, 李德龙, 等. 黄淮地区大豆种质资源对疫霉根腐病的抗病性评价 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(11): 2246-2252.
- [23] CHAUDHARY S, ANDERSON T R, PARK S J, et al. Comparison of Screening Methods for Resistance to *Fusarium* root rot in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Phytopathology, 2006, 154(5): 303-308.

Study on Physiological and Biochemical Responses of Soybean Infected by *Fusarium oxysporum*

DAI Ying¹, YANG Ya-xin¹, LIAO Xin¹,
SUN Xia¹, WANG Yu-shuang¹, WU Xiao-ling^{1,2},
YANG Wen-yu^{1,2}, Chang Xiao-li^{1,2}

1. College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Sichuan Engineering Research Center for Crop Strip Intercropping System, Chengdu 611130, China

Abstract: In order to clarify the physiological and biochemical responses of soybean infected by *Fusarium oxysporum*, the pathogen responsible for soybean root rot, the changes in peroxidase (POD) activity and soluble sugar, malondialdehyde (MDA), chlorophyll and lignin contents in different tissues of the roots and shoots of the seedlings of resistant and susceptible soybean varieties were examined at 7 d and 15 d after infection by *F. oxysporum* with the method of sorghum seed inoculation. The results showed that the relative contents of soluble sugar and MDA decreased in both the resistant and the susceptible varieties, but the relative contents of chlorophyll and root lignin and POD activity were significantly higher in the resistant varieties than in the susceptible varieties. In conclusion, the contents of chlorophyll, soluble sugar, MDA and lignin and the activity of POD are associated with the resistance of soybean to root rot, and they can be used as the major reference for resistance identification and disease-resistance breeding research.

Key words: soybean root rot; *Fusarium oxysporum*; physiological and biochemical indexes

责任编辑 夏娟