

大豆种荚应答镰刀菌侵染的叶绿素荧光成像规律

龙希洋¹, 肖新力^{1,2}, 张启辉¹, 杨文钰¹, 刘江^{1,2}, 张静^{1,3}

(1. 四川农业大学 农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室, 四川 成都 611130; 2. 四川农业大学 生态农业研究所, 四川 成都 611130; 3. 四川农业大学 园艺学院, 四川 成都 611130)

摘要: 【目的】种荚是大豆 *Glycine max* 防御霉菌侵染的第 1 道防线, 部分大豆品种种荚具有极佳的田间霉变抗性, 本研究目的在于寻找与豆荚霉变抗性相关的快速鉴定指标。【方法】采用叶绿素荧光成像技术, 以高抗大豆 ‘QWT15-2’、中抗大豆 ‘E1’ 和易感大豆 ‘E314’ 为研究对象, 对离体种荚接种轮枝镰刀菌 *Fusarium verticillioides*, 监测其叶绿素荧光参数变化情况。【结果】大豆种荚接种霉菌 24 h 后, 通过叶绿素荧光成像系统可清晰观察到豆荚表皮病斑, 叶绿素荧光参数发生显著变化。霉菌侵染后 0~5 d, 大豆种荚初始荧光参数初始荧光 (F_0)、最大荧光 (F_m)、可变荧光 (F_v) 大幅降低, 非光化学猝灭系数 q_N 上升、 Q_{NP} 下降, 最大光化学量子产量 (F_v/F_m)、实际光化学效率 (Φ_{PSII}) 及电子传递速率 (R_{ET}) 均呈下降趋势。【结论】高抗大豆 ‘QWT15-2’ 维持了较健康的组织形态, 各荧光参数表现稳定; 中抗大豆 ‘E1’ 和感病大豆 ‘E314’ 受霉菌侵染影响, 其表皮组织破坏严重、荧光参数变化幅度大; 其中 F_v/F_m 、 F_m 、 F_v 、 q_N 和 Q_{NP} 荧光参数对霉菌侵染响应敏感, 可作为评价大豆种荚田间霉变抗性的鉴定指标。图 4 参 17

关键词: 大豆; 种荚; 轮枝镰刀菌; 叶绿素荧光成像; 抗性鉴定

中图分类号: S332 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2020)03-0540-07

Imaging rules in chlorophyll fluorescence of soybean pods in response to *Fusarium verticillioides*

LONG Xiyang¹, XIAO Xinli^{1,2}, ZHANG Qihui¹, YANG Wenyu¹, LIU Jiang^{1,2}, ZHANG Jing^{1,3}

(1. Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Southwest, Ministry of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China; 2. Institute of Ecological Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China; 3. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China)

Abstract: [Objective] The current study, in order to establish the index for the rapid identification of the resistance of soybean pods, is focused on three cultivars of cultivars, namely the high-resistant cultivar ‘QWT15-2’, the medium-resistant cultivar ‘E1’ and the sensitive cultivar ‘E314’. [Method] The pods were first inoculated with *Fusarium verticillioides* in vitro, and then the changes of chlorophyll fluorescence parameters in pods were monitored with the employment of chlorophyll fluorescence imaging technology. [Result] After 24 hours of inoculation, the epidermal lesions of the pods were clearly observed through the chlorophyll fluorescence imaging system, and there was a significant change in the fluorescence parameters. To be specific, 0–5 days after mold infection, there was a significant decrease in the initial fluorescence parameters F_0 , F_m , F_v of soybean pods, an increase in the non-photochemical quenching coefficient q_N and a decrease in

收稿日期: 2019-05-20; 修回日期: 2019-06-18

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0300209); 国家自然科学基金资助项目 (31971853); 中国博士后科学基金资助项目 (2017T100707)

作者简介: 龙希洋, 从事作物化学生态学研究。E-mail: longxiyang1@stu.sicau.edu.cn。通信作者: 张静, 副教授, 从事作物抗逆生理研究。E-mail: zhangjing@sicau.edu.cn

Q_{NP} , which was accompanied with an inclination of decline in the maximum photochemical efficiency F_v/F_m , actual photochemical efficiency Φ_{PSII} and electron transport rate R_{ET} . [Conclusion] The high-resistant cultivar ‘QWT15-2’ maintained a relatively healthy tissue with stable fluorescence parameters. The medium-resistant cultivar ‘E1’ and the sensitive cultivar ‘E314’ were affected by mold infection with severe epidermal tissue damage and significant change in the fluorescence parameters. Fluorescence parameters such as F_v/F_m , F_m , F_v , q_N and Q_{NP} are sensitive to mold infection and can be used as an indicator to evaluate the resistance of soybean pods in the field. [Ch, 4 fig. 17 ref.]

Key words: soybean; pod; *Fusarium verticillioides*; chlorophyll fluorescence imaging; resistance identification

大豆 *Glycine max* 富含蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸、异黄酮, 具有丰富的营养价值^[1]。中国西南地区“寡日、高湿、小温差”的特殊生态环境, 致使大豆抗逆性差、极易发生田间霉变、品质劣变严重, 危害食品安全, 这成为阻碍南方大豆发展的重要瓶颈^[2]; 选育田间霉变抗性品种是突破该瓶颈问题的有效途径之一。前期研究表明: 轮枝镰刀菌 *Fusarium verticillioides* 为大豆田间霉变的主要致病菌^[3], 不同大豆种质资源的种荚对轮枝镰刀菌的感病性存在显著差异^[4]。禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 会抑制小麦 *Triticum aestivum* 光合作用相关基因导致其光合作用下降^[5]; 尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 会破坏枸杞 *Lycium sp.* 叶片的光合机构, 使得感病品种的叶绿体色素降解, 净光合速率、蒸腾速率以及叶绿素荧光参数急剧下降^[6]。叶绿素荧光动力学技术在测定植物光合过程中光系统对光能的吸收、分配等方面具有独特作用, 能直观显示植物受胁迫时的变化过程, 可检测由病毒、细菌、真菌感染引起的生理变化; 其在黄瓜 *Cucumis sativus*^[7]、小麦^[8]、水稻 *Oryza sativa*^[9] 等多种植物上得到了较快的普及和广泛应用^[10]。本研究以豆荚抗性不同的 3 个典型大豆种质为试验材料, 监测轮枝镰刀菌接种在豆荚后叶绿素荧光参数变化情况, 旨在寻找评价大豆种荚田间霉变抗性的指标, 为抗性大豆新品种的选育奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与处理

试验于 2018 年在四川农业大学教学科研园区 (四川雅安) 进行。供试材料为 3 种不同抗性大豆种质, 包括高抗大豆 ‘QWT15-2’、中抗大豆 ‘E1’ 和易感大豆 ‘E314’。供试的轮枝镰刀菌由农业部西南作物生理生态与耕作学重点实验室提供。

大豆于 6 月 15 日播种, 生长至鼓粒期 (R6) 时取样; 采集长势一致的健康、饱满豆荚, 用冰盒带回实验室, 以无菌水冲洗干净备用。每个种荚用无菌注射器破损 3 处表皮, 向损伤部位接种 5 μL 菌悬液 ($10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$), 对照组用等量的无菌水处理。随后, 将豆荚置于铺有湿润滤纸的无菌培养皿中, 10 皿·品种⁻¹, 接种种荚 3~6 个·皿⁻¹。于接种后 1、2、3、4、5 d 监测种荚的叶绿素荧光参数。

1.2 叶绿素荧光成像分析

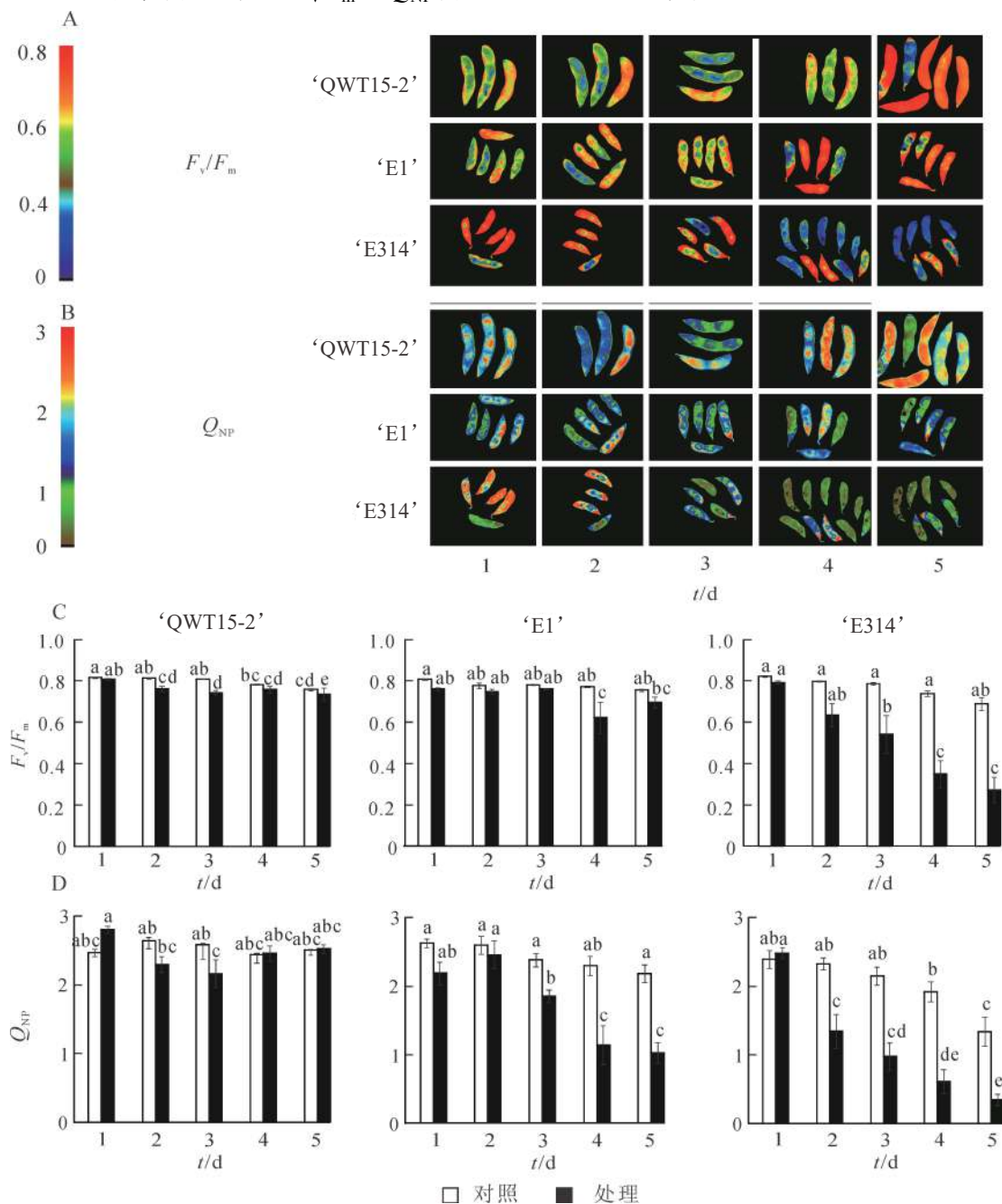
种荚经暗适应 20 min 后, 采用 CF Imager 叶绿素荧光成像系统 (英国 Technologica 公司) 测定其初始荧光 (F_0)、最大荧光 (F_m)、可变荧光 (F_v)、PS II 最大光化学量子产量 (F_v/F_m)、非光化学猝灭系数 (Q_{NP} , q_N)、PS II 实际光化学量子产量 (Φ_{PSII})、光电子传递速率 (R_{ET}) 等叶绿素荧光参数, 并对荧光参数进行成像分析。采用 Microsoft Excel 2010 软件整理数据、作图, SPSS 23.0 软件统计分析。

2 结果与分析

2.1 种荚接种轮枝镰刀菌后的荧光成像及参数分析

对不同抗性大豆种荚接种霉菌 1~5 d 内的叶绿素荧光参数进行时序性监测。由图 1A~B 可知: 高抗大豆 ‘QWT15-2’ 在接菌培养的 5 d 内, 未发现明显的病斑产生; 中抗大豆 ‘E1’ 和感病大豆 ‘E314’ 则在接菌 1 d 后即出现了小块病斑, 并随着接种培养时间的延长, 病斑处颜色和区域增加越加明显, 荧光强度显著降低。 F_v/F_m 和 Q_{NP} 的成像变化与豆荚的受害呈现出明显的相关性。在图 1C~D 中, 高抗大豆 ‘QWT15-2’ 在接种 5 d 后, 与对照相比, F_v/F_m 具有明显的应答响应, 荧光强度虽成显著降低, 但仍可以达到 0.73, 而中抗和敏感的 ‘E1’ 和 ‘E314’ 病斑处, F_v/F_m 图像分别在接种后 4 和 1 d 呈现深

蓝色，且 F_v/F_m 荧光强度明显降低，与受感染处组织受到破坏的程度表现出一致性， Q_{NP} 的荧光成像和参数与之呈现出类似的变化特征。总体表现为种荚霉变病级越高，病斑处区域则越大， F_v/F_m 和 Q_{NP} 越低，变化幅度越大；高抗种荚的 F_v/F_m 和 Q_{NP} 高于中抗和敏感品种，但变化幅度小于中抗和敏感品种。



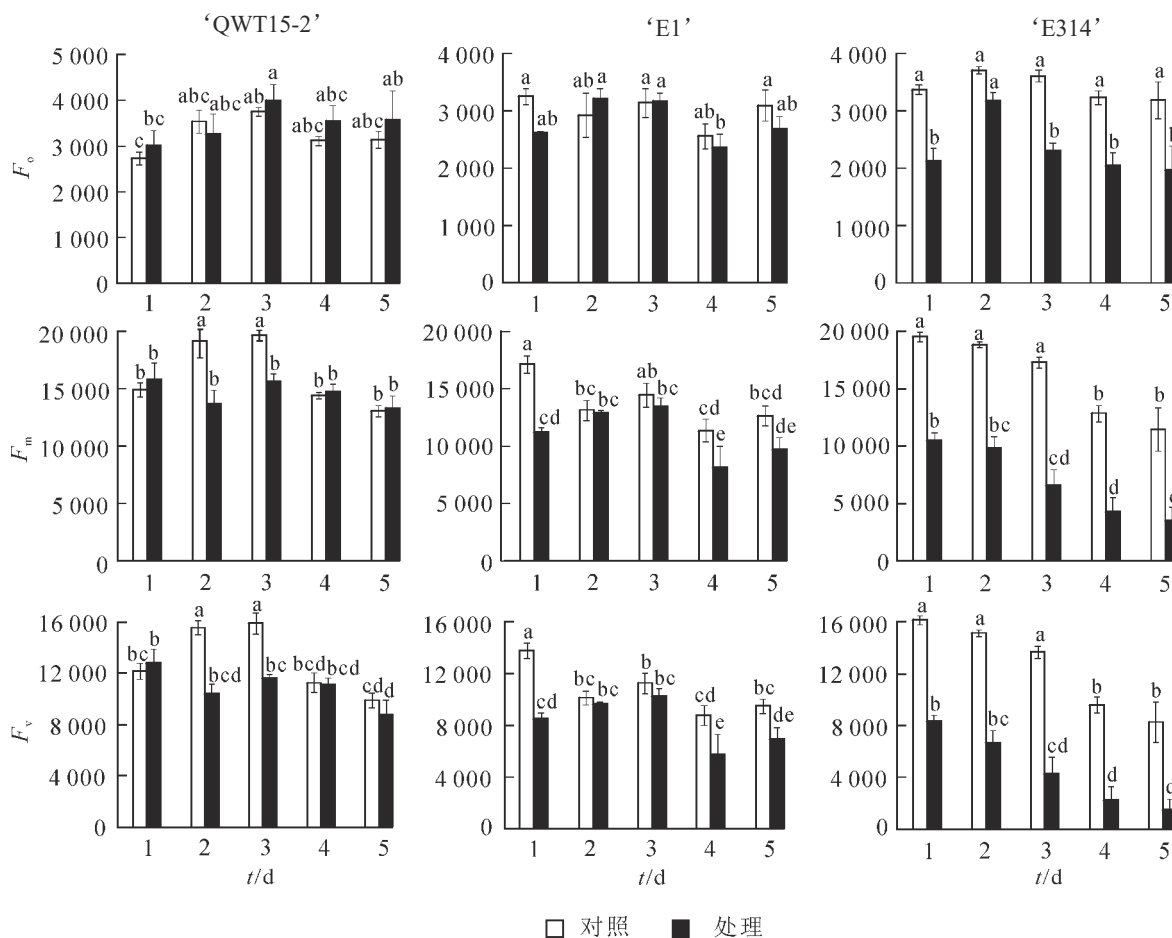
不同小写字母表示不同培养时间各参数差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 接种轮枝镰刀菌后的种荚 F_v/F_m 和 Q_{NP} 成像及参数变化

Figure 1 F_v/F_m and Q_{NP} imaging and parameter changes of soybean pods after inoculation with *F. verticillioides*

2.2 接种过程中的种荚初始荧光参数变化

大豆种荚接种轮枝镰刀菌后，其初始叶绿素荧光参数发生变化，不同抗性豆荚的变化存在差异(图 2)。与对照相比，在接菌培养的 5 d 内，易感大豆‘E314’的初始荧光参数变化最为剧烈， F_0 、 F_m 及 F_v 均呈降低趋势，且在培养的 5 d 内，各参数的平均降低幅度分别为 32%、58%、66%；中抗大豆‘E1’的初始荧光参数变化较为缓和， F_0 、 F_m 及 F_v 也主要呈降低趋势，其各参数的平均降低幅度分别为 6%、19%、22%；而高抗大豆‘QWT15-2’的 3 个初始荧光参数变化幅度仅为 7%、8%、13%。这表明种荚受轮枝镰刀菌感染后，高抗材料初始荧光变化幅度最小，中抗材料其次，敏感材料最大；且随着



不同小写字母表示不同培养时间各参数差异显著 ($P < 0.05$)

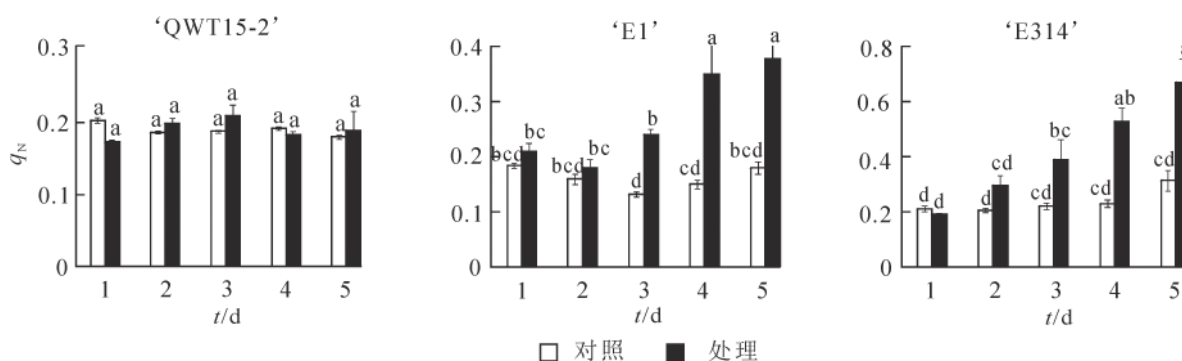
图 2 接种轮枝镰刀菌后的种荚初始叶绿素荧光参数变化

Figure 2 Initial chlorophyll fluorescence parameters changes of soybean pods after inoculation with *F. verticilloides*

侵染时间延长，种荚霉变程度加剧， F_m 和 F_v 具有明显的应答响应。

2.3 接种过程中种荚的非光化学猝灭系数

接种轮枝镰刀菌的 5 d 内，不同抗性大豆种荚的非光化学猝灭系数 q_N 随接种时间变化如图 3 所示。与对照相比，随着接种时间的延长，‘QWT15-2’的 q_N 几乎没有变化；‘E1’和‘E314’种荚 q_N 不断增高，且变化幅度明显大于‘QWT15-2’。‘E1’种荚 q_N 在接种 3 d 后呈极显著变化；而‘E314’种荚 q_N 变化时间更为提前，在接种 2 d 后呈显著变化；‘QWT15-2’在整个接种过程中变化都不显著，表明荧光参数 q_N 在响应时间和变化幅度上，对霉菌侵染应答敏感。



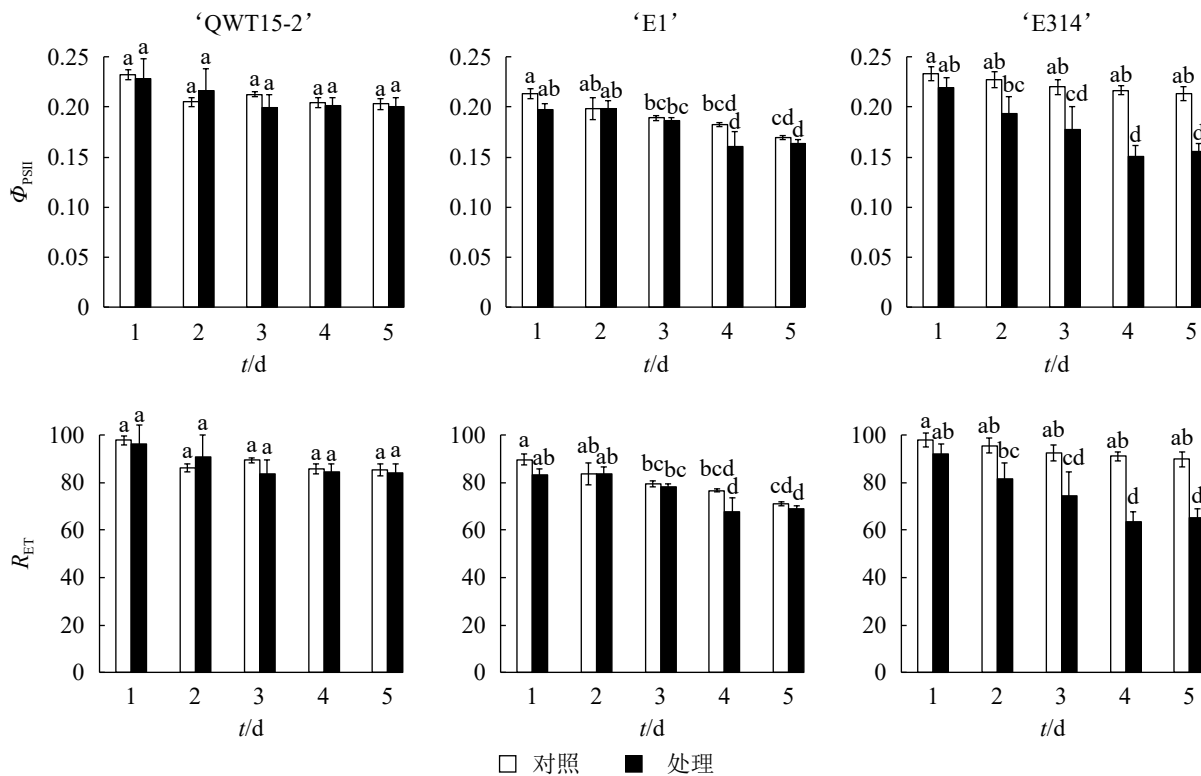
不同小写字母表示不同培养时间各参数差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 接种轮枝镰刀菌后种荚非光化学猝灭系数

Figure 3 Non-chemical quenching coefficient changes of soybean pods after inoculation with *F. verticilloides*

2.4 接种过程中的种荚光化学效率与电子传递效率

对接种豆荚的光化学效率与电子传递效率进行了时序性监测。由图4可知：在接种的5 d内，与对照相比，3个不同抗性大豆豆荚的光化学效率 Φ_{PSII} 与电子传递速率 R_{ET} 均呈下降趋势，但仅在易感材料‘E314’中响应剧烈。



不同小写字母表示不同培养时间各参数差异显著 ($P < 0.05$)

图4 接种轮枝镰刀菌后的种荚光化学效率与电子传递效率

Figure 4 Photochemical efficiency and R_{ET} changes of soybean pods after inoculation with *F. verticilloides*

3 讨论

叶绿素荧光成像技术是植物光合生理的无损探针，近年来在植物抗逆生理机制和植物病害检测方面得到了广泛应用。对水稻^[9]、小麦^[11]、山葡萄 *Vitis amurensis*^[12] 等植物的病害研究发现，各种病害均会降低植物 F_v/F_m ，抑制 PS II 活性。杨峰等^[13] 运用荧光成像技术发现，根腐病导致大豆叶片 PS II 反应中心受到影响，使得 F_v/F_m 、 Q_{NP} 和 Φ_{PSII} 下降；何金祥等^[14] 在烟草 *Nicotiana tabacum* 中发现花叶病毒感染叶片时，PS II 的光捕获效率和光化学反应效率降低，光合电子传递和碳同化受到抑制， F_v/F_m 、 Q_{NP} 和 Φ_{PSII} 显著低于健康叶片。表明在生物胁迫检测中，叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 Q_{NP} 和 Φ_{PSII} 等对生物胁迫具有较好的灵敏度，能实现对染病植株与健康植株的早期识别，也能定量分析植株的染病程度。

在本研究中，种荚接种轮枝镰刀菌后，其荧光参数与对照差异明显，高抗大豆‘QWT15-2’参数变化幅度最小，其次是中抗大豆‘E1’，易感大豆‘E314’最大。接种后 F_0 、 F_m 及 F_v 呈降低趋势， F_0 为光照下最小荧光，主要与 PS II 天线色素内的最初激子密度及叶绿素含量有关^[15]，由于种荚组织被病原菌破坏，叶绿素含量急剧降低，导致 F_0 明显降低； F_m 和 F_v 分别反映了 PS II 的电子传递情况和电子传递受体 QA 的还原情况^[16]，与对照相比，接菌后‘E1’和‘E314’的 PS II 活性下降，电子传递速率 R_{ET} 降低。表明霉菌侵染大豆种荚后，会损坏其光合机构，导致电子传递受阻，使得种荚初始荧光降低，而‘QWT15-2’维持了较为健康的组织形态，初始荧光参数表现稳定。在初始荧光中， F_m 和 F_v 在中抗大豆‘E1’和易感大豆‘E314’较早应答病菌侵染，随着侵染时间延长，种荚霉变程度加剧， F_m 和 F_v 具有明显的应答响应。

最大光化学效率 F_v/F_m 及光化学效率 Φ_{PSII} 的降低也表明种荚受霉菌侵染后，种荚健康组织逐渐受

损, 其 PS II 反应中心的原初光能捕获效率降低, 导致实际的光化学效率 Φ_{PSII} 降低, 其中 F_v/F_m 在 3 个不同抗性材料中应答最为明显。非光化学猝灭系数 q_N 和 Q_{NP} 反映了 PS II 天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递的部分和植物热耗散的能力^[17], 种荚在霉菌侵染条件下, ‘E1’ 和 ‘E314’ 种荚的健康组织逐步霉变, 病变处光能未被光合吸收利用, 使得天线色素吸收的多余光能以热能形式耗散掉。在整个接种过程中, ‘QWT15-2’ 种荚 q_N 和 Q_{NP} 变化都不显著, 而 ‘E1’ 和 ‘E314’ 种荚 q_N 和 Q_{NP} 分别在接种 3 和 2 d 后呈显著变化, 表明 q_N 和 Q_{NP} 在响应时间和变化幅度上, 对霉菌侵染应答敏感。

因而在上述实验过程中, 高抗大豆 ‘QWT15-2’ 在接种病原菌后, 种荚各荧光参数变化均不大, 仅 F_v/F_m 变化明显; 中抗大豆 ‘E1’ 中, 荧光参数下降幅度更为明显, 多个参数在霉变严重的 4~5 d 达到显著水平, 以 F_m 、 F_v 、 q_N 和 Q_{NP} 的应答更为明显; 而易感大豆 ‘E314’ 种荚在霉菌侵染 2 d 时, 其光系统活性即发生显著变化, 所有荧光参数均发生了极显著响应。

4 结论

轮枝镰刀菌侵染大豆种荚后, 不同抗性大豆种荚的荧光参数响应迅速。霉菌造成种荚光合机构损伤, 叶绿素降解, 热耗散能力降低, 阻碍了光合电子传递, 导致光合速率下降; 随着离体培养时间的延长, 病原菌扩散加快、霉变程度加剧, 健康种荚组织逐渐被霉菌破坏, 使得种荚 F_o 、 F_m 、 F_v 、 F_v/F_m 、 Q_{NP} 、 Φ_{PSII} 、 R_{ET} 下降; 其中, 霉菌侵染不同抗性大豆 1 d 后, F_v/F_m 即有明显响应, 均呈现下降趋势, 可作为筛选抗性大豆种质的首要评价指标; F_m 、 F_v 、 q_N 和 Q_{NP} 在中抗和易感品种中也具有显著响应, 可作为次要评价指标。南方大豆田间霉变严重, 基于叶绿素荧光成像技术实现对豆荚霉变的早期监测预报具有重要作用, 后续工作将扩大检测群体, 进一步验证荧光参数的应用效果, 为抗病新品种选育奠定基础。

5 参考文献

- [1] 邓俊才, 雷婷, 钟蕾, 等. 大豆主要农艺性状与收获期籽粒田间霉变抗性的相关及通径分析[J]. 大豆科学, 2015, 34(5): 837–842.
DENG Juncai, LEI Ting, ZHONG Lei, et al. The correlation and path analysis between the main agronomic traits and the resistance of soybean to seed mildew in field during harvest season [J]. *Soybean Sci*, 2015, 34(5): 837–842.
- [2] 邓俊才, 刘江, 雷婷, 等. 收获期籽粒田间霉变对大豆产量和品质的影响[J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(1): 77–82.
DENG Juncai, LIU Jiang, LEI Ting, et al. Effect of seed mildew in field on yield and quality of soybean during harvest season [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2015, 37(1): 77–82.
- [3] LIU Jiang, DENG Juncai, YANG Caiqiong, et al. Fungal diversity in field mold-damaged soybean fruits and pathogenicity identification based on high-throughput rDNA sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 779–790.
- [4] LIU Jiang, DENG Juncai, ZHANG Ke, et al. Pod mildew on soybeans can mitigate the damage to the seed arising from field mold at harvest time [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(48): 9135–9142.
- [5] 杨在东, 马信, 吴世文, 等. 小麦 NPR1-like 基因的克隆及赤霉菌诱导下的表达分析[J]. 作物学报, 2013, 39(10): 1775–1782.
YANG Zaidong, MA Xin, WU Shiwen, et al. Cloning of NPR1-like genes and their response to *Fusarium graminearum* infection in wheat [J]. *Acta Agron Sin*, 2013, 39(10): 1775–1782.
- [6] 李捷, 冯丽丹, 王有科, 等. 尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 侵染对枸杞光合和荧光参数的影响[J]. 中国沙漠, 2015, 35(6): 1565–1572.
LI Jie, FENG Lidan, WANG Youke, et al. Effects of Infection by *Fusarium oxysporum* on photosynthetic and chlorophyll fluorescence parameters of *Lycium* sp. [J]. *J Desert Res*, 2015, 35(6): 1565–1572.
- [7] SUI Yuanyuan, YU Haiye, ZHANG Lei, et al. Chlorophyll fluorescence spectrum analysis of greenhouse cucumber disease and insect damage [J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2012, 32(5): 1292–1295.
- [8] BAURIEGEL E, GIEBEL A, HERPPICH W B. Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging [J]. *J Appl Bot Food Qual*, 2010, 83(2): 196–203.

- [9] LIU Lina, YU Haiyan, ZHANG Lei, *et al.* Rice blast prediction model based on analysis of chlorophyll fluorescence spectrum [J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2014, **31**(4): 1003 – 1006.
- [10] BAURIEGEL E, HERPPICH W. Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging for early detection of plant diseases, with special reference to *Fusarium* spec. infections on wheat [J]. *Agriculture*, 2014, **4**(1): 32 – 57.
- [11] PEREZ C E, RODRIGUES FÁ, MOREIRA W R, *et al.* Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae* [J]. *Phytopathology*, 2014, **104**(2): 143 – 149.
- [12] 许培磊, 范书田, 刘迎雪, 等. 山葡萄应答霜霉病感染过程中叶绿素荧光成像的变化[J]. 园艺学报, 2015, **42**(7): 1378 – 1384.
XU Peilei, FAN Shutian, LIU Yingxue, *et al.* Image changes in chlorophyll fluorescence of *Vitis amurensis* in response to downy mildew [J]. *Acta Horti Sin*, 2015, **42**(7): 1378 – 1384.
- [13] 杨峰, 黄山, 武晓玲, 等. 根腐病胁迫对大豆光谱特征和叶绿素荧光特性的影响[J]. 大豆科学, 2013, **32**(4): 490 – 495, 500.
YANG Feng, HUANG Shan, WU Xiaoling, *et al.* Effects of phytophthora root rot stress on canopy spectra reflectance and chlorophyll fluorescence characteristics of soybean [J]. *Soybean Sci*, 2013, **32**(4): 490 – 495, 500.
- [14] 何金祥, 黄宁珍, 付传明, 等. 烟草花叶病毒对烟草叶片光合特征和 POD 表达的影响[J]. 西北植物学报, 2009, **29**(5): 867 – 873.
HE Jinxiang, HUANG Ningzhen, FU Chuanming, *et al.* Photosynthesis characters and peroxidase activities of tobacco leaves infected by tobacco mosaic virus [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2009, **29**(5): 867 – 873.
- [15] BAKER N R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, **59**(1): 89 – 113.
- [16] LI Guangqing, XIE Zhujie, YAO Xueqin, *et al.* Studies on the relationship between chlorophyll fluorescence parameters and cold tolerance of cauliflower [J]. *Acta Horti Sin*, 2010, **37**(12): 2001 – 2006.
- [17] IKBAL F E, HERNANDEZ J A, GREGORIO B E, *et al.* Enhanced salt-induced antioxidative responses involve a contribution of polyamine biosynthesis in grapevine plants [J]. *J Plant Physiol*, 2014, **171**(10): 779 – 788.