

司 佳,陶欣意,张思萌,等.根肿菌侵染对大白菜叶绿素荧光参数和光合特性的影响[J].江苏农业科学,2022,50(5):123-127.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.05.019

根肿菌侵染对大白菜叶绿素荧光参数和光合特性的影响

司 佳¹,陶欣意²,张思萌²,黄新彪¹,李光宁¹,王彦华¹,赵建军¹,冯大领²,轩淑欣¹

(1.河北农业大学园艺学院/河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室/河北省产业协同创新中心,河北保定 071001;

2.河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001)

摘要:以大白菜抗根肿病自交系 265 和感根肿病自交系 139 为试材,采用室内根肿菌人工接种技术,研究根肿菌侵染对不同抗性大白菜叶片叶绿素荧光参数及光合特性的影响。结果表明,接菌 3 d,139In 和 265In 根毛均有根肿菌侵染,且随着时间延长侵染率呈现先增加后减少的趋势,265In 早期根毛侵染率明显低于 139In,后期显著高于 139In;皮层侵染 265In 明显滞后于 139In,且侵染数均明显低于 139In。随着根肿菌侵染率的变化,大白菜叶片叶绿素荧光参数最大光化学效率(F_v/F_m)、非光化学淬灭(NPQ)和光化学淬灭(q_p)呈现规律性变化,265In 和 139In 在多个时间点较其对照表现下降。受根肿菌侵染的影响,接菌后 35、70 d,265In 和 139In 光合速率、气孔导度和蒸腾速率均较对照降低,胞间二氧化碳浓度较对照上升;除气孔导度外,其他参数变化在 70 d 时差异达到显著水平。该结果为进一步研究根肿菌致病机理和大白菜抗根肿病育种的早期诊断提供了理论依据。

关键词:大白菜;根肿菌侵染;叶绿素荧光;光合特性

中图分类号: S436.341.1+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)05-0123-05

根肿病(clubroot)是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron.)广泛侵染油菜、大白菜、萝卜、甘蓝等十字花科作物根部引起的一种严重的土传病害,由于其休眠孢子可在土壤中存活 20 年以上^[1],给该病害的防治带来了极大困难,导致全世界十字花科作物每年减产 10%~15%^[2]。我国浙江、广东、辽宁、山东、湖南、北京、河北、辽宁、吉林、黑龙江等 27 个省(直辖市)均有根肿病发生^[3]。近年来,大白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* Makino)感染根肿病的面积逐年增加,且呈蔓延趋势,严重影响到了我国大白菜的生产和市场的正常供应,造成极大的经济损失。

长期以来,国内外对十字花科根肿病的发病规

律^[4]、防治方法^[5]、根肿菌的生活史^[6]、生理小种分化^[7]、接种鉴定方法^[8]研究很多,近年来大白菜根肿病的抗性分子标记及分子标记辅助育种研究^[9-11]也日益受到重视。光合机构是绿色植物吸收利用光能进行光合生理反应的场所,也是暗反应的生化场所,被认为是逆境胁迫的敏感部位。叶绿素荧光参数是一组用于描述植物光合作用机制和光合生理状况的变量或常数值,反映了植物“内在性”的特点,被视为是研究植物光合作用与环境关系的内在探针。二者被作为生物或非生物逆境胁迫机理研究的重要内容^[12-14]。卢晓霞等研究发现,油菜感根肿病植株的光合速率显著降低^[15]。然而关于根肿菌侵染对大白菜光合生理方面影响的研究鲜有报道。

笔者以大白菜抗根肿病自交系和高感根肿病自交系为试材,以根肿菌 4 号生理小种为病原菌,研究根肿菌人工接种侵染不同抗性大白菜的过程及对叶片叶绿素荧光参数及光合特性的影响,拟从光合生理角度为进一步研究根肿菌致病机理和大白菜抗根肿病育种的早期诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物材料为 2 份大白菜自交系:265 和 139,前

收稿日期:2021-07-04

基金项目:|河北省创新能力提升计划(编号:20592109D);河北省引智人才项目(编号:2019YX023A);国家重点研发计划(编号:2017YFD0101802、2016YFD0100204-17);河北省重点研发计划(编号:21326311D-2);河北农业大学大学生创新创业训练计划基金(编号:2020198)。

作者简介:司 佳(2000—),女,河北涿州人,主要从事蔬菜学方面的研究。E-mail:1759824533@qq.com。

通信作者:轩淑欣,博士,副研究员,主要从事分子细胞遗传及育种应用研究,E-mail:yyxsx@hebau.edu.cn;冯大领,博士,副教授,主要从事植物种质资源创新及育种应用研究,E-mail:bjdalingfeng@163.com。

期以根肿菌 4 号生理小种接种鉴定,265 表现为抗病,139 表现为感病。

根肿病菌菌源来自重庆市武隆区根肿病发病区的大白菜病根,以 4 号生理小种为主,经多次室内大白菜接菌繁殖,病根洗净后保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

试验于 2020 年 10 月至 2021 年 3 月在河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室及人工气候室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 菌液制备 从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 取出适量保存的病根,置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的黑暗条件下,腐烂 4~5 d,促进休眠孢子萌发。将病根放入榨汁机中,加入适量无菌水,打碎至匀浆,分别使用 2、4、8 层纱布过滤,收集菌液于 1 000 mL 锥形瓶中,用血球计数板在显微镜下统计孢子数目,并调整孢子浓度至 1×10^8 个/mL。置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 内使用。

1.2.2 试验材料的接种与培养 提前将大白菜自交系 265 和 139 种子催芽,待种子露白后播种在 50 孔装有基质的穴盘中,每孔播种 1 粒。播种后第 10 天,利用注射器将 24 h 内制备的菌液从幼苗根基部注入基质中,每株接种菌液 3 mL,以注射清水的为对照(CK)。整个苗期生长温度控制在白天 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、晚上 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持适宜的基质湿度。接种 40 d 后,将幼苗从穴盘移栽到直径 10 cm 的营养钵中,在相同环境中生长 30 d。

1.2.3 根肿菌侵染过程观察 分别在接菌后 3、5、7、10、13、15、22、30 d 将大白菜的根轻轻地从基质中取出,自来水洗净后,蒸馏水冲洗,然后置于 FAA 固定液中固定 24 h 以上。取整条根,无菌水冲洗后,用苯胺蓝染色液染色 2~3 min,再用无菌水将表面染液冲掉,置于载玻片上盖上盖玻片,在显微镜下观察根肿菌侵染根毛和皮层情况。每个材料观察 100 条根毛,重复 3 次,统计根毛侵染率;记录 3 个视野的平均皮层侵染数。

根毛侵染率 = (侵染的根毛数/观察的根毛总数) $\times 100\%$ 。

1.2.4 叶绿素荧光参数测定 分别在接菌后 5、10、15、22、30、40 d 以及移植到营养钵生长 30 d (接菌后 70 d),取幼苗叶片,置于黑暗环境适应 30 min 后,利用 Fluorcam7 叶绿素荧光仪测定大白菜功能叶片的叶绿素荧光参数,主要包括最大光化学效率(F_v/F_m)、光化学猝灭系数(q_p)和非光化学猝灭系数(NPQ),3 次重复。

1.2.5 光合参数测定 于接菌后 35 d 和 70 d,每株选取顶部第 3~4 张完全展开的叶片,采用 LC Pro-SD 全自动便携式光合仪进行光合参数测定,主要包括净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾系数(T_r)和胞间 CO_2 浓度(C_i),每份材料测 3 株,以未接菌的为对照。

1.3 数据处理与分析

采用 Excel 2020 和 SPSS 18.0 统计分析软件进行数据分析,应用最小显著差数法(LSD)进行差异显著性检验。

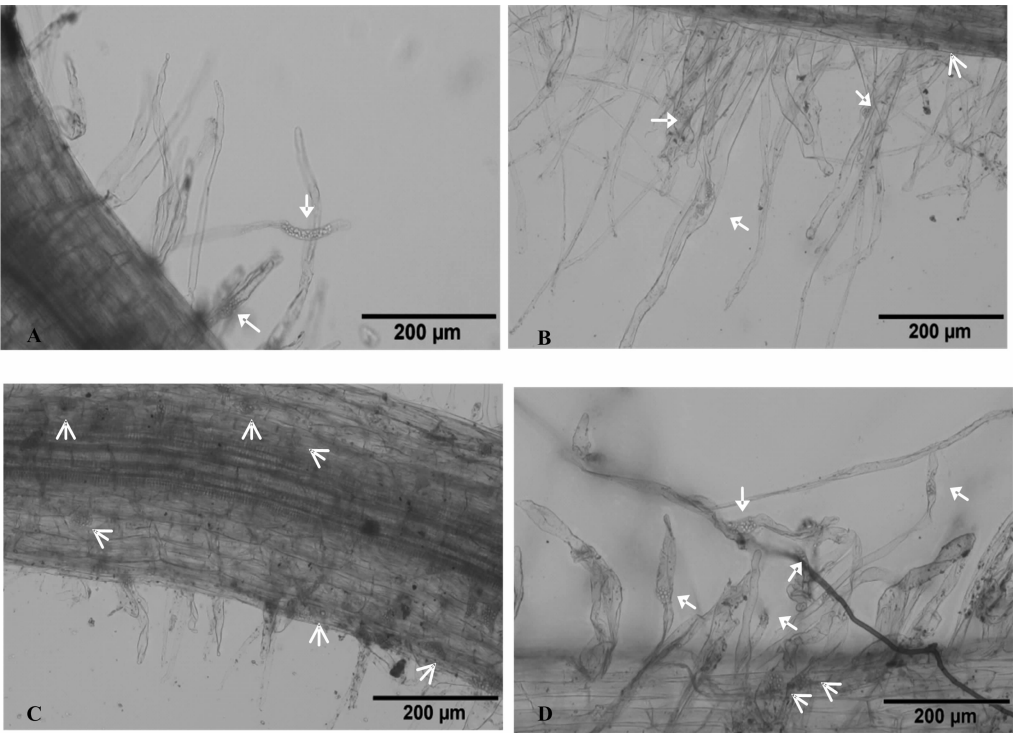
2 结果与分析

2.1 根肿菌侵染大白菜根毛和皮层情况观察

对接菌后的抗病自交系 265 (265In) 和感病自交系 139 (139In) 根肿菌侵染根毛和皮层情况进行观察统计(图 1、表 1)。结果表明,接菌 3 d,139In 根毛就有了根肿菌侵染,随着时间延长,侵染率逐渐增多,接菌 10~13 d 达到最多,侵染率为 47.0%~51.0%,15 d 之后,侵染率逐渐下降,有的根毛中可见残余的孢子残体;接菌 5 d,皮层中可见有孢子团,随着时间延长,皮层侵染的孢子团数逐渐增多,到 30 d,每个视野皮层中的孢子团数平均可达 17.3 个(表 1,图 1-A 至图 1-C)。相对于 139In,265In 中的根毛侵染率和皮层侵染数各时期均较低。接菌 3 d,265In 根毛也偶尔可见有根肿菌侵染,但侵染率仅为 0.05%;侵染率达到最高是在接菌后 13~15 d,随后逐渐下降。相对于根毛侵染,同一时期 265In 侵染皮层的孢子团数远低于 139In,30 d 时 265In 每个视野皮层中的孢子团数平均为 6.3 个/视野(表 1、图 1-D)。

2.2 根肿菌侵染对大白菜叶片叶绿素荧光特性的影响

2.2.1 根肿菌侵染对大白菜叶片 F_v/F_m 的影响 叶绿素荧光参数 F_v/F_m 是光抑制程度的一个重要指标,反映的是光系统 II (PS II) 最大光能转换效率。由图 2 可知,抗病自交系 265,接菌材料和对照表现出相同的变化趋势,除在接菌后 5、10、40 d 接菌材料的 F_v/F_m 值略小于对照外,其他时期 F_v/F_m 值大小基本相同。感病自交系 139 与对照材料 139CK 不同时期 F_v/F_m 值基本一致,恒定在 0.83 左右;而接菌材料 139In F_v/F_m 值在接种后 10、22、40 d 均明显低于 139CK (图 2)。以上结果表明,2 份材料在接种后的不同时期发生了不同程度的光



A. 139In 接菌 5 d; B. 139In 接菌 10 d; C. 139In 接菌 22 d; D. 265In 接菌 15 d

“实箭头”指示根毛侵染;“空箭头”指示皮层侵染
图1 根肿菌侵染大白菜根毛和皮层显微观察

表 1 接菌不同天数大白菜根毛和皮层侵染情况统计

| 接菌后 时间(d) | 根毛侵染率(%) | | 皮层侵染孢子团数(个/视野) | |
|--------------|----------|-------|----------------|-------|
| | 139In | 265In | 139In | 265In |
| 3 | 20.0a | 0.05b | 0 | 0 |
| 5 | 26.8a | 11.0b | 2.0a | 0b |
| 7 | 38.0a | 30.0b | 4.3a | 1.3b |
| 10 | 51.0a | 37.0b | 7.3a | 3.0b |
| 13 | 47.0a | 45.0a | 10.3a | 5.3b |
| 15 | 40.0b | 46.0a | 12.3a | 4.3b |
| 22 | 34.0b | 43.0a | 13.3a | 7.3b |
| 30 | 18.6b | 31.0a | 17.3a | 6.3b |

注:同行数据后不同小写字母表示 2 份材料间差异显著 ($P < 0.05$)。

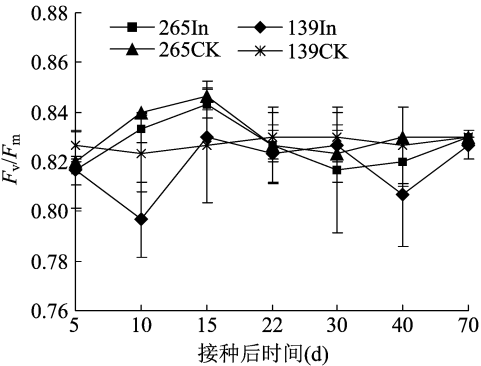


图2 根肿菌侵染对大白菜叶片 F_v/F_m 的影响

抑制,其中,139In 受抑制程度明显大于 265In 受光抑制程度。

2.2.2 根肿菌侵染对大白菜叶片 NPQ 的影响 叶绿素荧光参数 NPQ 值的升高可以保护光合系统免受损害,以尽可能维持植物的光合性能。由图 3 可知,在生长过程中,265CK 叶片的 NPQ 表现为持续降低的趋势,139CK 叶片的 NPQ 表现为先下降后上升又下降的变化趋势。与对照不同,尽管接菌后的 5~40 d,139In 和 265In 叶片的 NPQ 均表现为低于对照的现象,139In 在接菌后的 5~10 d、265In 在接菌后的 5~15 d 均呈现上升趋势,且 265In 上升幅度大于 139In,这可能与根肿菌侵染、大白菜被迫启用光合机构自我保护机制有关。15~70 d,265In 表现为与 265CK 一致的持续降低的变化趋势且 NPQ 数值相近,而 139In 在 10~15 d 表现为下降的趋势,此后 15~40 d 处于 NPQ 数值相对恒定且低于 139CK 水平,40~70 d 又出现了升高的趋势。

2.2.3 根肿菌侵染对大白菜叶片 q_p 的影响 叶绿素荧光参数 q_p 反映植物光合活性的高低,其升高或降低幅度反映光合效率在不同条件下增强或受抑程度。由图 4 可知,265CK 和 139CK 对应接种后 5~10 d,叶片 q_p 变化趋势相反,前者表现下降,后者表现轻微上升,此后二者 q_p 值均表现为 10~15 d 基

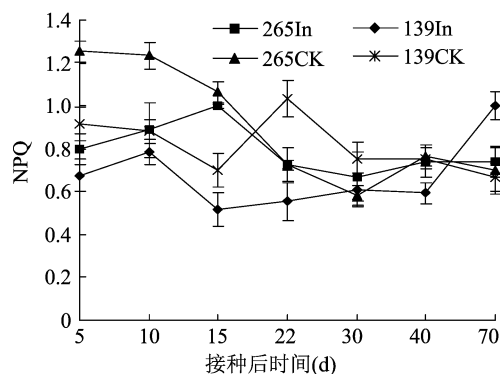
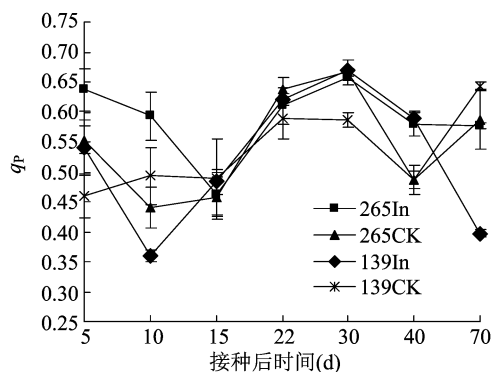


图3 根肿菌侵染对大白菜叶片 NPQ 的影响

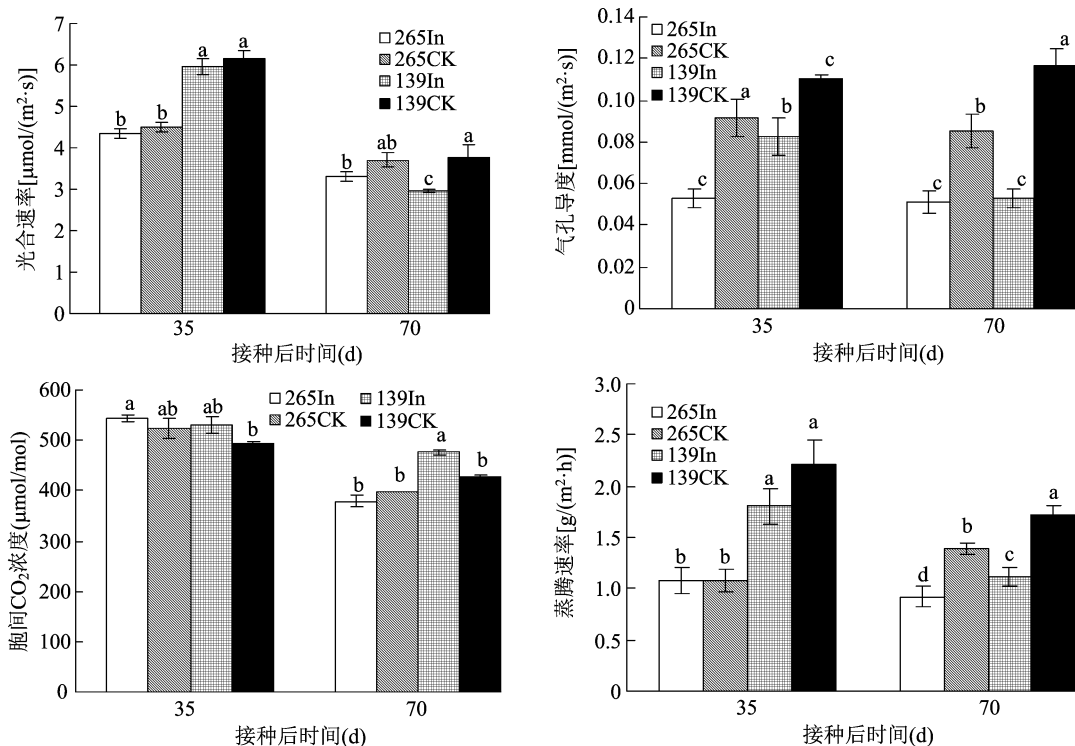
图4 根肿菌侵染对大白菜叶片 q_p 的影响

本保持不变、15 ~ 30 d 上升、30 ~ 40 d 下降、40 ~ 70 d 又上升的相同趋势。265In 与 265CK 表现为相同的变化趋势,但在 5 ~ 15 d 及 30 ~ 70 d 265In q_p 值均高于 265CK。139In 与 139CK 相比,5 ~ 10 d 和 40 ~ 70 d 叶片 q_p 值表现为相反的变化趋势,且在 5 d 和 70 d 达到最小值;10 ~ 40 d 表现为先上升后下降的趋势,且 139In q_p 值高于或接近 139CK。139In 叶片 q_p 值 5、10、70 d 显著低于 265In,其他时间接近 265In。表明根肿菌侵染导致感病大白菜叶片光合效率降低程度大于抗病大白菜叶片。

2.3 根肿菌侵染对大白菜叶片光合参数的影响

利用 LC Pro-SD 全自动便携式光合仪对大白

菜抗、感自交系接菌后 35 d 和 70 d 的光合作用参数进行测定。由图 5 可知,接菌后 35 d,抗、感自交系 265In 和 139In 的光合速率、气孔导度和蒸腾速率均分别较其对照 265CK 和 139CK 有所下降,胞间二氧化碳浓度有所上升,但除气孔导度二者下降显著外,其他差异均未达到显著水平。接菌后 70 d,265In 与对照 265CK 相比,光合速率、气孔导度、胞间二氧化碳浓度和蒸腾速率均明显下降,但光合速率和胞间二氧化碳浓度未达到显著差异;139In 与对照 139CK 相比,光合速率、气孔导度和蒸腾速率均显著下降,胞间二氧化碳浓度显著上升。说明根肿菌侵染严重影响了大白菜感病材料的光合作用能力。



柱上不同小写字母表示 2 份材料接种与对照间的差异显著性 ($P < 0.05$)

图5 根肿菌侵染对大白菜光合参数的影响

3 讨论与结论

前人研究发现,供试白菜在接菌后 4 d 可观察到根毛侵染^[16-17],本试验对接菌后 3 d 的大白菜抗病材料和感病材料根毛进行观察,均观察到根毛中的根肿菌原生质团,说明根肿菌侵染时间可能发生的更早。接菌后早期(13 d 前)265In 的根毛侵染率低于 139In,后期(15 d 后)265In 的根毛侵染率显著高于 139In,265In 根肿菌侵染皮层的天数明显滞后于 139In,且侵染数目也显著少于 139In,表明大白菜 265 对根肿菌的抗性反应不是发生在病原菌与寄主的识别阶段,而应该是病原菌与寄主反应诱发了某些抗病基因表达,抑制了其进一步侵染皮层所致。

根肿菌侵染大白菜抗病材料和感病材料,对其叶片叶绿素荧光特性^[18-19]均造成了明显影响。随着接菌天数的延长,256In 和 139In 的 F_v/F_m 和 NPQ 均随其对照表现出了相似的变化趋势,又随菌侵染根毛和皮层的历程又较其对照明显降低,但 139In 出现明显降低的时间要早于 265In,降幅也大于 265In。与 F_v/F_m 和 NPQ 不同,265In 的 q_P 与对照变化趋势相似,但 15 d 前和 30 d 后均高于对照;139In 的 q_P 与对照相比,5 ~ 15 d 和 40 ~ 70 d 变化趋势相反,且逐渐低于对照;15 ~ 40 d 这 2 份材料接菌前后变化趋势相同且较接近。表明在早期均侵染根毛拓展到皮层及后期发病过程中,抗病自交系 265 相对于感病自交系 139 保持了较高的光合活性。

植物净光合速率的大小直接体现了植物光合作用能力的强弱^[20],蒸腾速率的大小反映了植物调节水分的能力^[21]。接菌后 2 份大白菜 P_n 、 G_s 和 T_r 均明显下降, C_i 除 265 接种后 70 d 有所下降外均较对照上升,表面根肿菌侵染严重影响了大白菜感病材料的光合作用能力。139In 与 139CK 相比,随着根肿菌侵染时间的延长,4 个指标的变化均达到显著水平,说明感病大白菜适应逆境的能力变弱。

参考文献:

- [1] Wallenhammar A C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels[J]. Plant Pathology, 1996, 45(4): 710 - 719.
- [2] Dixon G R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 194 - 202.
- [3] Chai A L, Xie X W, Shi Y X, et al. Research status of clubroot

- (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(S1): 142 - 153.
- [4] Osaki K, Tanaka S, Ito S I. Pathogenicity of *Plasmodiophora brassicae* populations from small, spheroid, resistant - type clubroot galls on roots of clubroot - resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) [J]. Journal of General Plant Pathology, 2008, 74(3): 242 - 245.
- [5] Donald C, Porter I. Integrated control of clubroot [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 289 - 303.
- [6] 肖崇刚, 郭向华. 甘蓝根肿菌的生物学特性研究[J]. 菌物系统, 2002, 21(4): 597 - 603.
- [7] 黄蓉, 胡建坤, 张景云, 等. 江西省蔬菜根肿菌致病性分化研究[J]. 植物病理学报, 2017, 47(1): 133 - 137.
- [8] 张淑霞, 杨晓云, 司朝光, 等. 大白菜根肿病人工接种鉴定方法比较[J]. 山东农业科学, 2010, 42(1): 78 - 79.
- [9] Hayashida N, Takabatake Y, Nakazawa N, et al. Construction of a practical SCAR marker linked to clubroot resistance in Chinese cabbage, with intensive analysis of *HC352b* genes [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2008, 77(2): 150 - 154.
- [10] 朴钟云, 吴迪, 王森, 等. 大白菜抗根肿病近等基因系的分子标记辅助选育[J]. 园艺学报, 2010, 37(8): 1264 - 1272.
- [11] Kato T, Hatakeyama K, Fukino N, et al. Fine mapping of the clubroot resistance gene *CRb* and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa* [J]. Breeding Science, 2013, 63(1): 116 - 124.
- [12] 李媛媛, 王冰林, 钱程, 等. 根结线虫侵染对不同抗性番茄品种叶片叶绿素含量及其荧光参数的影响[J]. 中国蔬菜, 2015(12): 48 - 53.
- [13] 张慧, 黄秀凤, 徐华潮. 松材线虫自然侵染后松树感病进程中光合作用及抗氧化酶活性的变化[J]. 环境昆虫学报, 2014, 36(2): 139 - 144.
- [14] 陈连珠, 张雪彬, 杨小锋. 根际高温对快白菜根系结构、光合及叶绿素荧光参数的影响[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(2): 48 - 52.
- [15] 卢晓霞, 康晓慧, 付菊梅, 等. 油菜根肿病对油菜光合作用及酶活性的影响[J]. 广东农业科学, 2013, 40(24): 71 - 73, 81.
- [16] Hwang S F, Ahmed H U, Zhou Q, et al. Influence of cultivar resistance and inoculum density on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae* [J]. Plant Pathology, 2011, 60(5): 820 - 829.
- [17] 朱红丽, 肖崇刚, 陈国康, 等. 基于根肿菌早期侵染量的白菜抗性分析[J]. 植物保护学报, 2015, 42(4): 510 - 516.
- [18] 王冰林, 徐广宾, 李媛媛. 根结线虫侵染对茄子叶片叶绿素荧光特性的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(1): 94 - 97.
- [19] 王鹰翔, 张金池, 吴雁雯, 等. 喷播基质中土壤菌施用对紫穗槐幼苗光合特性和叶绿素荧光参数的影响[J]. 环境科学研究, 2017, 30(6): 902 - 910.
- [20] 侯智勇. 桉树无性系光合特性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [21] 朱红芳, 李晓锋, 奚丹丹, 等. 紫菜薹新组合 19 - 520 的光合作用能力分析[J]. 上海农业学报, 2021, 37(1): 28 - 34.