

# 感染大豆灰斑病菌后不同抗性的大豆品种叶绿素动态变化的研究<sup>\*</sup>

刘亚光<sup>1</sup> 李丽清<sup>2</sup> 马景生<sup>3</sup> 杨庆凯<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学农学院 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省粮食学校 150080; 3. 齐齐哈尔糖厂 161005)

**摘要** 本文采用了抗性不同的大豆品种,在 3~4 叶期接种,并于接种后 1~10 天内连续取样,然后测定其接种后叶片内叶绿素的含量。试验结果表明:无论是抗病品种,还是感病品种,在病菌侵入的初期,叶绿素 a b 的含量都有所下降;在病菌侵染后 7~10 天时,感病品种叶片内叶绿素 a b 含量比未接种对照低,而抗病品种叶片内叶绿素 a b 含量均明显高于未接种对照;另外,致病力不同的生理小种对叶绿素 a b 含量变化的影响不同,7 号生理小种对叶绿体的破坏能力最强,其次为 6 号生理小种,而 4 号生理小种则最弱,其中 1 号,2 号生理小种居中。抗病品种叶片内叶绿素 a/b 的比值明显高于感病品种,初步认为叶绿素 a/b 的比值可作为大豆品种对灰斑病抗性鉴定的一种生化指标。

**关键词** 大豆灰斑病菌; 叶绿素 a b 的含量; 抗病品种; 感病品种

**中图分类号** S565.034 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)01-0049-05

大豆灰斑病 (*Cercospora sojina* Hara) 作为一种世界性的重要病害,受到了国内外植物病理学家与遗传育种界的普遍关注,并对此开展了大量研究,如在大豆灰斑病的生物学特性、抗性遗传、抗源筛选和抗病育种、大豆灰斑病抗病基因分子标记以及大豆灰斑病的组织抗性和生化抗性等诸多方面,取得了不少有意义的结果。其中杨庆凯、李海英、张丽娟、曹越平等人在 10 多年大豆抗灰斑病遗传和抗性资源鉴定筛选的基础上,选择典型的抗感材料,对其组织抗性和生化抗性进行研究,他们认为抗病品种接种后叶片自由基增加是一种增加抗菌物质从而提高抗菌性的反应,并系统地分析了抗感品种接种灰斑病菌后 SOD、POD、MDA、木质素和可溶性蛋白的动态变化,其中抗性品种主要是通过结构抗性 or 增加生理活性物质而形成了生化抗性,而感病品种则是明显地依靠木质素的增加,在抑制病菌扩展的同时,形成了病斑,造成了为害。

尽管对大豆灰斑病的研究已有大量报道,但有关抗病机制的研究还不够全面和深入,如大豆灰斑病菌致病的化学原因,以及感染大豆灰斑病菌后不

同抗性的大豆品种体内总黄酮、多酚类物质、叶绿素含量、PAL 酶活性等动态变化与抗病性之间的关系还不清楚。由于叶片内叶绿素含量与光合作用密切相关,同时也受营养、光照等环境条件的影响。当植物感染病毒后,叶绿体受到破坏,叶绿素降解,光化学活性下降,光合磷酸化作用减弱,导致光合速率明显下降(陆京杰,1992)。刘庆元等(1984)的研究表明:不同黄瓜品种对霜霉病的抗性与其叶片内叶绿素含量呈正相关系;胥爱玲等(1995)认为:抗黄瓜霜霉病的品种,其抗病能力与叶片叶绿素含量呈正相关,而感病品种其抗病性与叶绿素含量无相关性。因此测定抗感品种叶片内叶绿素含量的变化,无论是在生理上,还是在选育品种以及抗性机制的研究等方面都很有必要。本实验将大豆灰斑病菌接种在感病品种(东农 1330 等)和抗病品种(东农 9674 等)的叶片上,测定感染该病菌后,叶片内叶绿素的含量来分析不同抗性的大豆品种体内叶绿素 a 或 b 的动态变化,旨在明确叶绿素含量的变化与抗病性之间的关系,从而对抗病育种以及抗源的筛选提供有利的理论依据。

<sup>\*</sup> 收稿日期 2000-01-06

作者简介:刘亚光:(1968-),女,东北农业大学讲师。现在读东北农业大学作物遗传与育种专业博士学位。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及接种处理

1.1.1 供试材料 抗灰斑病的品种:东农 9674和东农 1572;感灰斑病的品种:东农 1330 黑农 39和东农 95-165 以上品种均由东北农业大学大豆研究所提供

1.1.2 供试菌种 大豆灰斑病菌 1号、2号、4号、6号和 7号生理小种均由东北农业大学大豆研究所提供。

1.1.3 材料准备及接种处理 采用盆栽大豆苗(保证每盆 4株苗),在大豆第四片复叶完全展开时进行接种处理,将刚刚配制好的浓度均为  $1.5 \times 10^4$  个/ml不同生理小种的孢子悬浮液,用喷雾器分别以相同的喷液量均匀地喷洒在大豆叶片上。对照组以同样的方法喷洒 3%蔗糖溶液,然后用塑料膜将各处理保湿 48小时。

1.1.4 取样方法 于接种后的第 1~10天连续取样,每次分别取对照和处理组各供试品种的相同叶位的叶片(第三片复叶)8~10片,然后将叶片立即

叶绿素的含量 ( $\text{mg g}^{-1}$ ) = 浓度 ( $\text{mg L}^{-1}$ )  $\times$  提取液总体积 (ml)  $\div$  重量 (g)  $\times 10^3$

叶绿素含量的变化率 (%) =  $\frac{\text{接种后供试品种叶片叶绿素含量} - \text{对照植株叶片叶绿素含量}}{\text{对照植株叶片叶绿素含量}} \times 100$

## 2 结果与分析

### 2.1 感染病菌叶片内叶绿素 a 的动态变化规律

用不同生理小种的灰斑病菌侵染抗性不同的品种后叶片内叶绿素 a 的变化如图 1所示:无论是抗病品种还是感病品种,其叶片内叶绿素 a 的含量于接种后 2~4天内均低于对照;另外有一明显的规律即:抗病品种东农 1572接 2 6 7号小种后的第 10天时,叶绿素 a 的含量均显著高于对照,其中抗病品种东农 9674 东农 91-135和东农 1572接种 6号小种后的第 10天时,叶绿素 a 的含量分别比对照高 105.7%、102.7%和 111.12%;而感病品种东农 95-165接不同小种 2 6 7后于第 10天时,叶绿素 a 的含量均明显低于对照,其中感病品种东农 95-165 东农 1330和黑农 39接种 6号小种第 6天起,叶片内叶绿素 a 的含量明显低于对照,至第 10天时叶绿素 a 的含量分别比对照降低了 58.12%、34.19%和 2.09%。

放入冰盒中,保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  中冰柜中备用。

### 1.2 测定方法<sup>[8 9 10]</sup>

1.2.1 叶绿素的提取 称取 0.5g 样品,加入少量的石英砂和 5~8ml 甲醇研磨提取,通过甲醇湿润的滤纸过滤于 20ml 刻度试管中,并继续多次用甲醇洗涤研磨样品,洗至残渣无色为止,合并过滤液,最后用甲醇定容至 12.5ml 摇匀备用。

1.2.2 叶绿素含量的测定 取 1ml 样品提取液加入 7ml 甲醇中,摇匀后用分光光度计分别测定 663nm 和 645nm 的光密度值,测定时用甲醇代替样品提取液为空白对照。把所测得的 663nm 和 645nm 下的 O.D. 值代入以下公式,分别求出叶绿素 a、b 和总叶绿素的浓度。

$$C_A = 12.7D_{663} - 2.59D_{645}$$

$$C_B = 22.9D_{645} - 4.67D_{663}$$

$$C_T = C_A + C_B = 20.3D_{645} + 8.04D_{663}$$

其中,  $C_A$ 、 $C_B$  分别为叶绿素 a 和 b 的浓度,  $C_T$  为叶绿素总浓度,单位为  $\text{mg/L}$ 。将以上所得的叶绿素 a、b 和总叶绿素的浓度代入下式,进一步求出单位重量样品中叶绿素的含量。

### 2.2 感染灰斑病菌后叶绿素 b 的动态变化

抗性不同大豆品种感染灰斑病菌后叶片内叶绿素 b 含量的变化如图 2所示,从中可以得出叶绿素 b 含量的变化趋势与上述叶绿素 a 含量的变化趋势总体是一致的,接种后第 10天时,抗病品种叶绿素 b 的含量均明显高于对照,而感病品种均低于对照水平。只是接种后第 1天时,叶片内叶绿素 b 含量变化的幅度远远高于叶绿素 a 含量的变化(见表 1),叶绿素 b 在叶片中的基础含量显著低于叶绿素 a,仅有 0.005mg/g,当受到灰斑病菌侵染后叶绿素 b 含量明显高于对照,尽管叶绿素 a 也相应增高,但由于基础含量就比较高,所以叶绿素 a 变化幅度明显低于叶绿素 b,这似乎可以说明叶绿素 b 对灰斑病菌侵染的反应比叶绿素 a 敏感。

### 2.3 不同生理小种的灰斑病菌对大豆叶片内叶绿素 a、b 的影响

由图 3可以看出感病品种东农 95-165接种不同生理叶片内叶绿素 a 的含量从第 8天起开始上升,第 9天时高于对照且明显高于接种其它生理小

种的处理;从接种后的第 6 天开始,接种 7 6和 2号小种的处理叶片内叶绿素 a 的含量呈直线下降趋势,而接种 1号生理小种叶片内叶绿素 a 的含量于第 8 天又出现一个峰值,当至第 9 天时叶绿素 a 含量均低于对照,其中接 6和 7号的叶绿素 a 含量下

降的幅度最大,从而可以说明 6 7号生理小种对叶绿素 a 的抑致程度最强,其次为 2号生理小种,而 4号生理小种最弱。这一结果恰好与田间对致病力不同的灰斑病菌生理小种的鉴定结果相一致;另外不同生理小种对感病品种东农 95- 165叶片内叶绿素

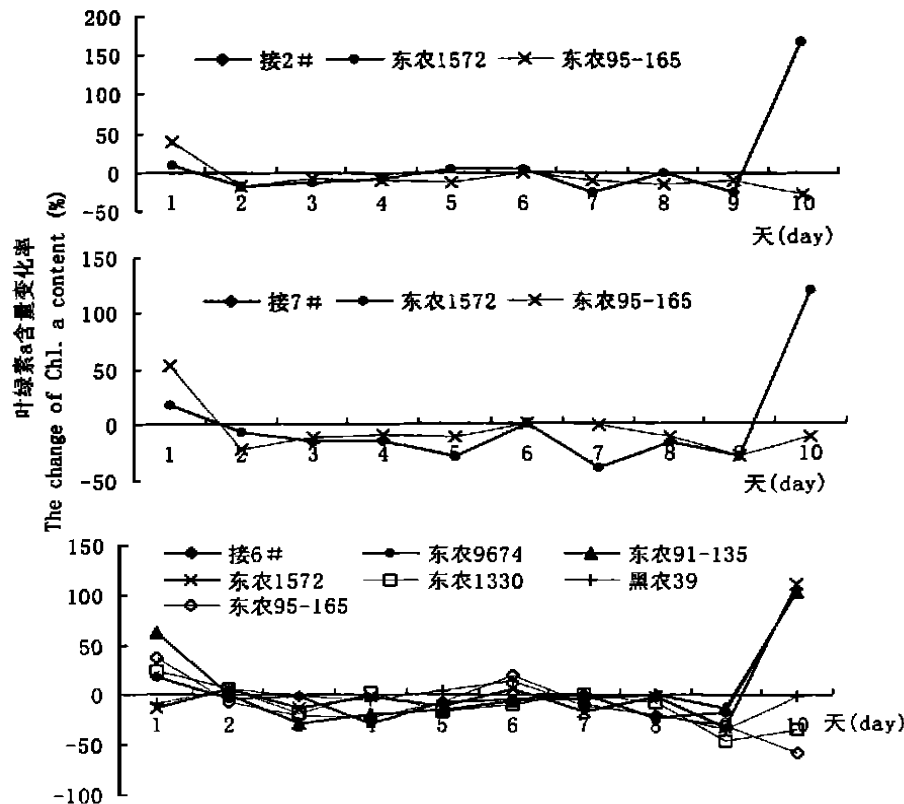


图 1 抗性不同的品种接种不同小种的灰斑病菌后叶片内叶绿素 a 含量的动态变化  
Fig. 1 The change of chlorophyll a content in leaves of varieties with different resistance after inoculated by different races of *C. sojina* at various time

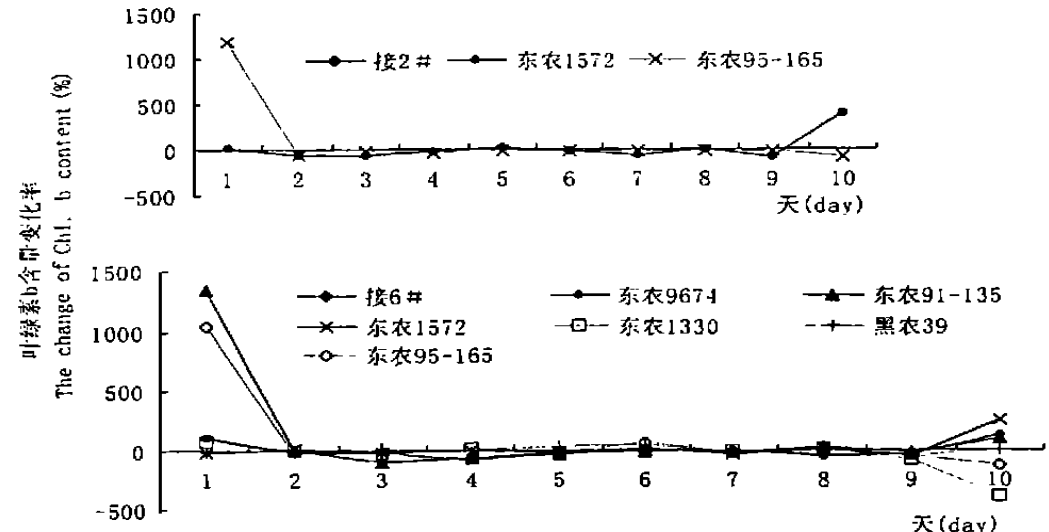


图 2 抗性不同的品种接种不同小种的灰斑病菌后叶片内叶绿素 b 含量的动态变化  
Fig. 2 The change of chlorophyll b content in leaves of varieties with different resistance after inoculated by different races of *C. sojina* at various time

表 1 接种 1天后叶片内叶绿素 a和叶绿素 b含量的比较

Table 1 Comparison of the content of chlorophyll a and b in leaves after the first day inoculating

生理小种	叶绿素 a含量 (mg /g)		变化率 (%)	生理小种	叶绿素 b含量 (mg /g)		变化率 (%)
	接种处理	对照			接种处理	对照	
2	0.213	0.153	39.4	2	0.06	0.005	1189.61
6	0.211	0.153	38.4	6	0.053	0.005	1040.81

b的影响趋势与叶绿素 a相一致,于接种后第 10天 平,下降幅度由高到低的顺序也是 7 6 2和 1号小种(见图 4)时叶绿素 b含量除 4号小种外 其它均低于对照水 种(见图 4)。

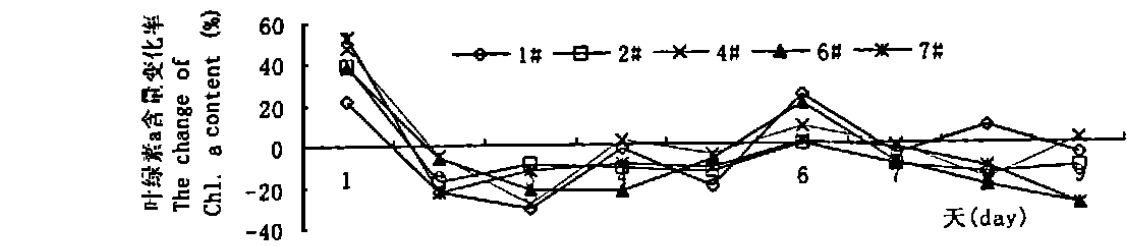


图 3 接种不同生理小种灰斑病菌后叶片内叶绿素 a含量的动态变化

Fig . 3 The change of chlorophyll a content in leaves inoculated by different races of *C. sojina* at various time

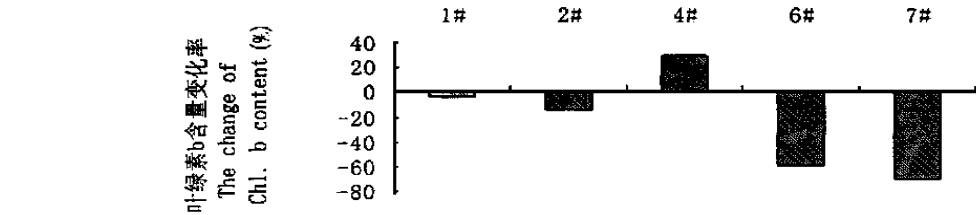


图 4 接种不同生理小种灰斑病第 10天叶片内叶绿素 b含量的动态变化

Fig . 4 The change of chlorophyll a content in leaves inoculated by different races of *C. sojina* at 10th day

另外还发现用不同致病力的生理小种侵染抗性不同的大豆品种后,叶绿素 a/b 比值具有一定的规律性,如表 2所示:总体来看在接种不同生理小种 10天内,三个抗病品种(东农 9674 东农 91- 135和东农 1572)的叶绿素 a/b比值的平均值比三个感病品种(东农 1330,黑农 39和东农 95- 165)的高,因此初步认为:可以把叶绿素 a/b 的比值作为鉴定品种抗病性的一种生化指标。

表 2 比较抗性不同的大豆品种接种不同生理小种 10天内叶绿素 a/b比值的平均值

Table 2 Difference of the specific values of Chlorophyll a and b in leaves of different resistant varieties during 10 days after inoculating

品种抗性	叶绿素 a /b的平均值				
	1	2	4	6	7
三个抗病品种平均值	4.66	5.64	9.19	5.26	7.21
三个感病品种平均值	4.4	3.87	3.65	4.97	5.18

3 结论与讨论

3.1 以上试验结果表明:大豆灰斑病菌侵入叶片的初期,造成叶绿素 a和叶绿素 b的含量均相应下降且低于对照,其原因可能是由于入侵的病菌抑致了光反应即光合磷酸化作用,或者由于致病毒素对叶绿体的破坏作用。已有试验证明:燕麦锈菌感染燕麦后导致叶绿素含量降低,整个叶片的光合作用被阻止,细链格孢产生的藤毒素阻止离体叶绿体的光合磷酸化的偶合机制(章元寿, 1996)。在大豆灰斑病菌侵染的中、后期,叶绿体结构的破坏、叶绿素的降解及光化学活性的下降,则可能是叶绿素含量降低的主要原因,这还须进一步深入的试验来证明。

3.2 对抗病品种来说,无论叶绿素 a还是叶绿素 b的含量均于接种后期明显高于对照,最终表现为抗病反应,产生很少的过敏性坏死斑或不产生病斑;相反对感病品种而言,叶绿素 a b的含量均低于对照。

最终表现为感病,出现大量的病斑

3.3 大豆灰斑病菌的不同生理小种对叶绿素 a/b 含量变化的影响不同,其中 6/7 号生理小种对叶绿素的合成抑制能力最强,其次为 2/1 号生理小种,而 4 号生理小种最弱

3.4 抗病品种叶片内叶绿素 a/b 的比值明显高于感病品种,初步认为叶绿素 a/b 的比值可以作为大豆品种对抗灰斑病抗性鉴定的一个生化指标

参 考 文 献

1 马淑梅,黑龙江省大豆灰斑病研究现状, [J]植物保护, 1992, 18 (4): 34~ 36  
2 钟兆西,大豆灰斑病生物学特性研究, [J]大豆科学, 1989, 8(3): 288~ 294  
3 赵骞,大豆灰斑病菌生理分化的研究, [C]1994,东北农业大学硕士学位论文

4 杨庆凯,大豆抗灰斑病遗传及育种问题, [J]东北农学院学报, 1988, 19(1): 10~ 15  
5 张晓刚,大豆灰斑病抗性遗传研究, [C]东北农业大学博士学位论文, 1991  
6 刘忠堂,大豆抗灰斑病育种简报, [J]大豆科学, 1983, 2(1): 30  
7 刘忠堂,抗灰斑病大豆新品种选育, [J]中国农业科学, 1986, 3 26~ 30  
8 刘秀明,宋平,孙成明,植物叶绿素测定方法的再研究, [J]江苏农业研究, 1999, 20(3): 46~ 47  
9 陆京杰,陈永萱,大豆花叶病毒 (SMV) 的侵染对大豆光合和生长的影响, [J]植物生理学通讯, 1992, 28 (2): 104~ 106  
10 郑东,黄卓烈,去莠津对黄瓜幼苗光合色素含量及酶活性的影响, [J]广东农业科学, 1996, 6 18~ 20  
11 刘庆元,朱燕民,黄瓜不同品种抗霜霉病机理的初步研究, [J]河南农学院学报, 1984, 3 56~ 59  
12 胥爱玲,张亚平,黄瓜抗病性与叶绿素含量的关系及遗传性研究, [J]新疆农业科学, 1995, 1 23~ 26  
13 章元寿,植物病理生理学, [M]江苏科学技术出版社, 1996 181 ~ 190

STUDY ON CHANGES OF CHLOROPHYLL IN LEAVES OF SOYBEAN VARIETIES  
OF DIFFERENT RESISTANCE TO *Cercospora soja* Hara

Liu Yaguang<sup>1</sup> Li Liqing<sup>2</sup> Ma Jingsheng<sup>3</sup> Yang Qingkai<sup>1</sup>

( 1. Northeast Agriculture University, Agriculture College, Harbin 150030;  
2. Heilongjiang Provincial Grain School 150080)

**Abstract** Soybean varieties of different resistance were inoculated with different races of *Cercospora soja* Hara at 3~ 4 leaf age, were sampled during 1~ 10 days after inoculation and the content of chlorophyll in leaves of both the inoculated and the healthy plants were measured. The results showed that when the leaves were primarily infected by *Cercospora soja* Hara, content of chlorophyll a and b in leaves of resistant varieties and susceptible varieties were lower than those of corresponding healthy leaves. During No. 7 day to No. 10 day after inoculating, the content of chlorophyll a and b in the leaves of susceptible varieties were lower than those of control, but the content of chlorophyll a and b in the leaves of resistant varieties were higher than control. Otherwise, the changes of chlorophyll a and b were differently effected by races of different pathogenicity, No. 7 race of *C. soja* was the strongest one to destroy structure of chloroplast, the second one was No. 6 race, the weakest one was No. 4 race, races No. 2 and No. 1 were in the middle. The specific values of chlorophyll a and b in leaves of resistant varieties were higher than those in susceptible varieties, we preliminarily considered that the specific value of chlorophyll a and b can be used as a biochemical marker for identification of soybean resistance to froge-eye leaf spot.

**Key words** *Cercospora soja* Hara; Content of chlorophyll a and b; Resistant soybean varieties; Susceptible soybean varieties