

黄萎病菌粗毒素接种对感病和抗病茄子品种的一些酶类活性和光合特性的影响

李海莲¹ 侯喜林^{1,*} 易金鑫^{1,2} 卞永东³ 陈根娣³ 赵玲¹

¹南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ²江苏省农业科学院蔬菜研究所, 南京 210014;

³江苏省盐城市产品质量监督检验所, 江苏盐城 224000

提要 以黄萎病菌粗毒素接种不同茄子品种的结果表明: 接种后抗病品种比感病品种的过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性高, 而多酚氧化酶(PPO)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性则相对稳定; 前者叶的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)和细胞间 CO_2 浓度(C_i)的变化幅度比后者小, 但 72 h 后二者的叶片 P_n 、 G_s 、 T_r 都明显呈下降趋势。

关键词 粗毒素; 茄子; 酶活性; 光合特性; 黄萎病菌

Impacts on Some Enzyme Activities and Photosynthetic Characters in Susceptible and Resistant Eggplants by Inoculation with Crude Toxin Isolated from *Verticillium dahliae* Kleb

LI Hai-Lian¹, HOU Xi-Lin^{1,*}, YI Jin-Xin^{1,2}, BIAN Yong-Dong³, CHEN Gen-Di³, ZHAO Ling¹

¹National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095,

China; ²Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ³Yanchen Institute of

Supervision & Inspection on Product Quality of Jiangsu Province, Yanchen, Jiangsu 224000, China

Abstract The different eggplant varieties were inoculated with crude toxin isolated from *Verticillium dahliae* Kleb. The result showed that the peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) activities in resistant eggplants were higher than those in susceptible ones. However, polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activities were relatively stable. Meanwhile, the net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s), transpiration rate (T_r) and intercellular CO_2 concentration (C_i) in resistant eggplants were less than those in susceptible ones. While both eggplants displayed descending trend in P_n , G_s and T_r after inoculation for 72 h.

Key words crude toxin; eggplant; enzyme activity; photosynthetic character; *Verticillium dahliae* Kleb

茄子和小麦等多种植物中, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性与包括黄萎病在内的多种病害抗性有关系已有所报道^[1,2], 而作为与抗性有关的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 和苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 也屡见报道^[3,4], 但这 4 种酶在茄子抗黄萎病机制中报道还甚少。同时, 以病原菌粗毒素接种研究不同抗性茄子与这些酶活性和光合特性之间关系的报道则未见。本文检测茄子黄萎病病原菌粗毒素接种后, 不同抗性品种茄子的 POD、PPO、SOD 和 PAL 的活性以及叶片光合特性的变化, 以期能为抗性鉴定和遗传分析提供参考。

材料与方法

选用高抗茄子黄萎病的刚果茄 (*Solanum aethiopicum gilo* group, Sm. 98302) 和感病的栽培品种七叶茄 (*Solanum melongena* cv. Qiye, Sm. 90017)。两者都于 2003 年 11 月 25 日播种在温室内, 2004 年 1 月 5 日分苗, 播种与分苗的基质全部经过高温灭菌, 2004 年 2 月 18 日取处于四叶期的幼苗接种。

制备粗毒素时, 用从本地区发病植株上分离并纯化得到的茄子黄萎病病原菌 (*Verticillium dah-*

收稿 2004-09-23 修定 2005-06-16

*通讯作者 (E-mail: hx1@njau.edu.cn, Tel: 025-84395332)。

liae Kleb) 强致病菌株放在 Czapeck's 培养基上, 于 25℃ 恒温下振荡培养 ($120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 2 周后, 用 8 层纱布过滤, 以考马斯亮蓝法测定并调整粗毒素浓度至 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后, 用于接种。

接种于幼苗四叶期进行。接种前 1 d, 幼苗浇足水。接种当日, 直接把幼苗从营养钵中取出, 以自来水冲去附着于根部的基质, 再将第 1 片真叶以下部分置于 5 mL 离心管中, 加入粗毒素直至与管口平, 用封口膜密封管口, 以防止粗毒素蒸发, 以无菌水为对照, 接种苗置于 25℃ 恒温生长箱中, 12 h/12 h 光照/黑暗, 光照度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。分别于接种后 0、12、24、48、72 和 96 h 取 5 株测定第 3 位叶的光合特性。测定后再取叶片测定酶活性。

按 Giannopolitis 和 Rice 方法^[5]测定 SOD 活性。采用愈创木酚法^[6]测定 POD 活性。PPO 和 PAL 活性的测定参照文献 7 的方法。每个样品重复 3 次。

净光合速率 (net photosynthetic rate, P_n)、细胞内 CO_2 浓度 (intercellular CO_2 concentration, C_i)、蒸腾速率 (transpiration rate, T_r) 和气孔导度 (stomatal conductance, G_s) 的测定均采用便携式光合气体分析系统 (LI-6400, Li-Cor Inc, USA)。测定时用开放气路, 空气流速为 $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 叶室温度控制在 25℃, 相对湿度为 50%, CO_2 浓度控制在 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, 光照为人工光源, 光量子通量密度 (PPFD) 为 $450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。测定前叶片先在初始设定的条件下适应 5 min。

结果与讨论

1 粗毒素接种对茄子抗感品种叶中几种酶活性的影响

图 1 显示:

(1) 以粗毒素接种后, 抗病品种的 SOD 活性随着接种时间的延长而增加, 感病品种 SOD 活性变化与之趋势相同, 但其活性低于抗病品种 (图 1-a)。结果说明粗毒素接种后茄子植株清除氧自由基的能力增强。

(2) 粗毒素接种后, 抗病材料 POD 活性迅速升高, 48 h 即出现第 1 次峰值, 此时酶活性值约为接种前的 13.2 倍, 之后有所下降, 72 h 后活性又开始增加, 到 96 h 达到第 2 个高峰; 而感

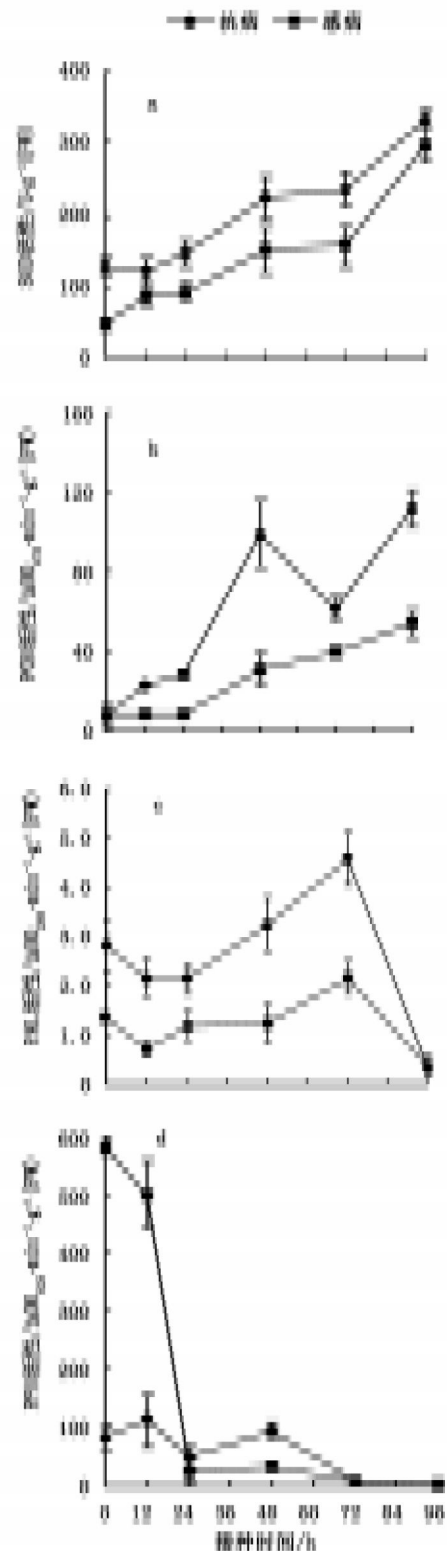


图 1 接种粗毒素后抗感品种茄子的 SOD、POD、PAL 和 PPO 活性变化

Fig.1 Changes in SOD, POD, PAL and PPO activities in resistant and susceptible eggplants after inoculation

病品种的POD活性在96 h内只是缓慢升高,且各个时期的酶活性均低于抗病品种(图1-b)。这与前人病原菌侵染植物过程的结果^[8]相符。第1个高峰与清除茄子体内过度积累的活性氧有关,因为病原菌侵染后会引引起体内大量活性氧的产生,即氧爆发^[9];第2个高峰出现可能是其参与了细胞壁木质素的合成,细胞壁木质化程度加深。抗病品种对活性氧的积累较感病品种敏感。

(3)接种粗毒素前,抗病品种的PAL活性高于感病品种;接种后,抗感品种的PAL活性升高,72 h达到峰值,而抗病品种的PAL活性增加较快,下降也较快,但其活性仍高于感品种(图1-c)。张俊华和崔崇士^[10]研究发现,在南瓜中病菌侵染后可引起PAL活性出现2次高峰。但我们只在72 h出现1个活性高峰,这可能和植物的种类、接种的方法及取样的时间有关,是否如此有待进一步研究。

(4)接种前,抗病品种的PPO活性显著低于感病品种。接种后,随着毒素蛋白对植物毒害作用的持续,抗、感植株体内酶活性出现了不同的变化趋势:抗病植株体内PPO活性相对稳定,48 h达到峰值后开始下降;而感病植株则在接种后即急剧下降,接种后24 h酶活性下降95.6%(图1-d)。Overeen等认为,PPO可催化皮苷配基氧化成毒素更强的化合物而杀死病原菌^[8]。徐建华等^[11]报道,植物受到侵染后,其PPO活性升高;但陈惠明等^[12]发现,感病烟草品种接种赤星病菌后,PPO活性下降。本文结果表明,感病品种接种病原菌后,其PPO活性先下降,而48 h后抗感品种活性则都下降。

2 粗毒素接种对茄子抗感品种的叶片光合特性的影响

图2显示:

(1)茄株接种黄萎病菌粗毒素后,感病品种的 T_r 在12 h出现第1个峰值,抗病品种则在24 h才略有上升,两者都在72 h出现峰值(图2-a)。48 h后 G_s 下降而 T_r 却有所上升,说明非气孔因数起主导作用。

(2)抗病品种叶片 C_i 为274.8~408.0 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$,接种后48 h出现峰值。在变化过程中, C_i 变动幅度小,始终维持在低水平上。而感病品种叶片 C_i

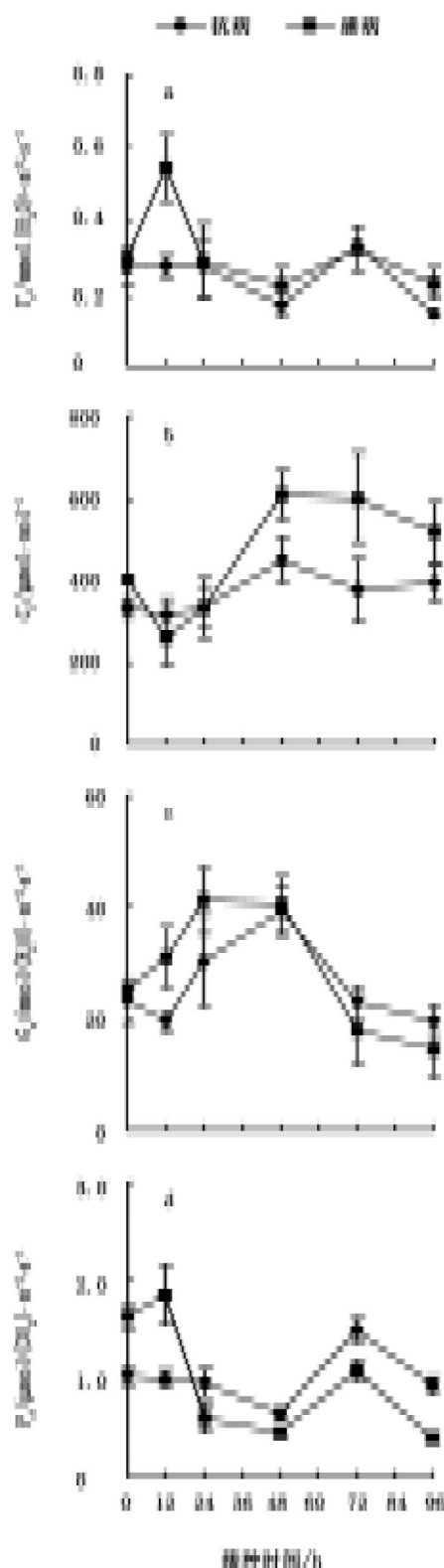


图2 抗感品种接种后 T_r 、 C_i 、 G_s 和 P_n 的变化
Fig. 2 Changes in T_r , C_i , G_s and P_n in resistant and susceptible eggplants after inoculation

在 $257.5 \sim 606.0 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, 峰值出现在 48 h。接种后 96 h 内, C_1 仍然维持在 $500.0 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上, 极显著高于抗病品种(图 2-b)。

(3) 接种茄子黄萎病菌粗毒素后, 抗病品种的 G_s 先出现轻微的下陷, 后迅速上升, 48 h 达到峰值; 而感病品种的气孔导度从一开始就上升, 24 h 后缓慢上升, 同样在 48 h 达到峰值。随后两者都明显下降(图 2-c)。

(4) 接种茄黄萎病菌粗毒素后, 茄叶不仅表现出失绿、失水、萎蔫等症状, 而且茄叶 P_n 变化很大(图 2-d)。接种后 96 h 内, 抗病品种 P_n 仅在 72 h 出现 1 个峰值; 而感病品种 P_n 总体上呈下降趋势, 但在 12 和 72 h 先后出现 2 个峰值。12 h 之前, 感病品种的 P_n 高于抗病品种, 随后急剧下降, 24 h 后则低于抗病品种。根据光合作用有气孔限制^[13]和非气孔限制^[14]的说法, 感病品种在接种 12 h 内 G_s 增大, 而抗病品种的 G_s 减小, 因此前者的 P_n 大于后者。由此看来, 在接种后的 12 h 内, P_n 的下降可能与气孔因素有关, 但随着时间的延长, 植物叶肉细胞已受到伤害, P_n 的降低除与气孔因素有关外, 非气孔因素也逐渐起主导作用。尤其是在 72 h 后, 随着侵染时间的延长, PAL 和 PPO 活性下降, 同时 P_n 也下降。据此我们推测, 在茄子接种黄萎病菌病原菌后, 茄子的 PPO 和 PAL 活性下降, 茄子本身合成植保素和木质素等抗性物质的能力遂下降^[15], 从而使光合机构受到伤害, 光合速率降低, 最后植株衰老死亡。因此, 感病品种的 P_n 显著低于抗病品种。

参考文献

- 1 席芳, 余挺, 钱冬梅. 茄子果实冷害生理的研究. 园艺学报, 1998, 25(3): 303~305
- 2 牛立元, 王鸿升, 石明旺. 小麦叶片 SOD、POD 活性与白粉病抗性关系. 河南职业技术师范学院学报, 2004, 32(4): 5~8
- 3 马奇祥, 何家泌. 不同抗性小麦品种感染根腐叶斑病前后生化特性的研究. 河南农业大学学报, 1992, 26(1): 38~43
- 4 Vidhyaskaran P. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. New York: Marcel Dekker, Inc, 1997. 380~381
- 5 Giannopolitis CN, Rice SK. Superoxide dismutase. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in breeding. Plant Physiol, 1977, (59): 315~318
- 6 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 164~165
- 7 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 317~323
- 8 孔庆科, 丁爱云, 刘招舰等. 茄子感染黄萎病菌前后酶活性的动态反应和同工酶变化. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(3): 271~274
- 9 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 过氧化物酶在棉花对枯萎病抗病性中的作用. 浙江农业大学学报, 1997, 23(2): 143~148
- 10 张俊华, 崔崇士. 不同抗性南瓜品种感染 *Phytophthora capsici* 病菌后几种酶活性测定. 东北农业大学学报, 2003, 34(2): 124~128
- 11 徐建华, 利容千, 王建波. 黄瓜不同抗病品种感染镰刀菌后几种酶活性的变化. 植物病理学报, 1995, 26(3): 239~242
- 12 陈惠明, 刘敬业, 冉邦定. 烟草感染赤星病后有关酶动态研究. 中国烟草学报, 1994, 2(2): 21~27
- 13 Cornic G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 187~188
- 14 Lawlor DW, Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell Environ, 2002, 25: 275~294
- 15 岳轩, 曾富华, 王荣臣. 杂交水稻对白叶枯病的诱导抗性与细胞内防御酶系统关系的初步研究. 植物病理学报, 1996, 26(2): 127~131