

不同抗性黄瓜自交系接种白粉病原菌后生理特性的变化*

蒋道伟, 司龙亭
(沈阳农业大学 园艺学院, 沈阳 110866)

摘 要: 对不同抗性黄瓜自交系接种白粉病原菌后,测定叶片中与抗性有关的叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白和 4 种防御酶活性。结果表明,叶绿素含量在接种后均呈先增加后减少的趋势,抗病自交系增加幅度较大,叶绿素含量高于感病自交系,黄瓜抗白粉病能力与叶绿素含量存在一定程度的正相关;可溶性糖含量在接种后先降低-后升高-再降低-再升高,抗病自交系可溶性糖含量高于感病自交系;可溶性蛋白含量在接菌后均逐渐升高,感病自交系的峰值出现早于抗病自交系,感病自交系对病原菌较敏感,抗病自交系对病菌的侵染反应呈一定程度的负相关;4 种酶的活性在接菌后都有不同程度的提高,抗病自交系酶活性增加幅度高于感病自交系,说明这 4 种酶在黄瓜对白粉病的抗性机制中起了重要作用。

关键词: 黄瓜自交系;白粉病原菌;生理变化

中图分类号:S436.421 文献标识码:A 文章编号:1004-1389(2010)08-0161-05

Changes of Physiological Characteristics in Different Cucumber
Breeding Lines Infected by *Sphaerotheca fuliginea*

JIANG Daowei and SI Longting
(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The content of chlorophyll, soluble sugar, and soluble protein, and the activity of four protective enzymes in the leaves of cucumber breeding lines inoculated with *Sphaerotheca fuliginea* were measured. The results showed that chlorophyll content increased firstly then decreased both in the resistant and susceptible lines after inoculation. However, the level and increment of chlorophyll content were higher in the resistant lines than in the susceptible lines, which implied that the cucumber resistance to powdery mildew was positive correlation with chlorophyll content. Soluble sugar content had a basically same trend of reduce- increase- reduce-increase after inoculation. Soluble sugar content of the resistant lines was higher than that of the susceptible lines. Soluble protein content increased both in the resistant and susceptible lines. The peak of soluble protein content appeared earlier in the susceptible lines than in the resistant lines, which indicated that the susceptible lines were more sensitive to the pathogen than the resistant lines. Negative relationship was found between disease resistance and *Sphaerotheca fuliginea* infection response. The activities of four enzymes, including polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (POD), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and catalase (CAT), increased with different amplitude after inoculation, the increment amplitude of the resistant lines was larger than that of the susceptible lines, this illustrated that the four enzymes play important roles in resistance mechanism to *Sphaerotheca fuliginea*

Key words: Cucumber breeding lines; *Sphaerotheca fuliginea*; Physiological changes

* 收稿日期:2009-12-27 修回日期:2010-02-10
基金项目:辽宁省“十五”科技攻关项目(2002215004)。
第一作者:蒋道伟,硕士,专业方向为黄瓜遗传育种研究。E-mail:jiangdwdsg@163.com
通讯作者:司龙亭,教授,博士生导师,主要从事蔬菜遗传育种研究。

白粉病是黄瓜主要病害之一。近年来,随着保护地栽培的发展和普及,该病害给黄瓜生产带来的损失也越来越大。黄瓜白粉病原菌是一种专性寄生菌,可通过气流传播,具有潜育期短,再感染频繁、流行性强等特点。白粉病原菌(*Sphaerotheca fuliginea*)侵入黄瓜后,叶片组织中会因为病菌的侵入发生一系列的变化。本试验通过对不同抗白粉病黄瓜自交系接种白粉病原菌后,其寄主生理变化及抗病机制进行深入研究,以期揭示黄瓜白粉病原菌与寄主间的相互关系,并为黄瓜抗病育种提供简单的生理指标。

1 材料与方法

1.1 材料

M3、M6 为抗病自交系,M12 为感病自交系。白粉病原菌为 *Sphaerotheca fuliginea*,以上材料由沈阳农业大学园艺学院黄瓜课题组提供。试验材料播于温室育苗盘中,每个品系设 3 次重复,播种 60 株。采用常规管理方法,在第 1 片真叶完全展开时移至营养钵中,2 叶 1 心时,均匀喷施含量为 4×10^4 /mL 的孢子悬浮液。

1.2 取样方法

接种处理前取相同部位功能叶,接种后每天取 1 次,共取 9 次,用于各项生理指标测定,测定结果取 3 次重复平均值。

1.3 生理指标的测定

参照沈伟其方法^[1]测定叶绿素含量,略有改动:取新鲜叶片 0.1 g,切成均匀细丝,加丙酮和乙醇($V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙醇}}=1:1$)混合溶液 10 mL,黑暗中浸泡至组织发白。以浸提液为对照,在紫外-可见分光光度计上测定 OD_{645} 、 OD_{663} 。叶绿素 a 和 b 含量参照下列公式计算: $Chla=12.71 OD_{663}-2.59 OD_{645}$; $Chlb=22.88 OD_{645}-4.67 OD_{663}$; $Chl(a+b)=Chla+Chlb=20.29 OD_{645}+8.04 OD_{663}$; 叶绿素含量 = $(C\times V)/(A\times 1000)$,其中 C 为叶绿素含量,V 为浸提液体积,A 为叶片鲜质量。

用蒽酮法^[2]测定可溶性糖含量。用考马斯亮蓝 G-250 法^[2]测定可溶性蛋白含量。

酶液提取参照 Moerschbacher 方法^[3],酶粗提液,置-20℃冰箱中保存备用。

用邹芳斌方法^[3]测定 PPO 活性,用 Cakmak 方法^[4]测定 POD 活性,用李新方法^[5]测定 PAL 活性。参照 Cakmak 方法^[4]测定 CAT 活性,略有

改动:用 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液将 0.6 mL 30% H_2O_2 稀释到 100 mL 做底物溶液。将 1.0 mL 底物溶液和 3.9 mL 蒸馏水混匀,于 25℃ 水浴平衡 1 min,再加入 0.1 mL 酶液,在 240 nm 处,以蒸馏水为对照,测定吸光度,每隔 1 min 记录 1 次结果,至 OD_{240} 速度达到平稳时,连续测 5 min,以每分钟 OD 值降低 0.0436 的酶量为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 接菌后叶绿素含量的变化

从图 1 可以看出,接菌前,抗病自交系叶绿素含量高于感病自交系;接菌后,各自交系叶绿素含量均呈增加的趋势,抗病自交系 M3、M6 增幅较大,感病自交系 M12 增幅较小;抗病自交系峰值出现在第 3 天,而感病自交系峰值出现在第 2 天,峰值出现较早;达到峰值后,各自交系叶绿素含量都出现不同程度的下降,抗病自交系叶绿素含量一直高于感病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前,抗病自交系间叶绿素含量差异呈显著水平,接菌后第 4~6 天,抗病自交系间叶绿素含量差异呈极显著水平,接菌前后,抗感自交系间叶绿素含量差异均呈极显著水平。

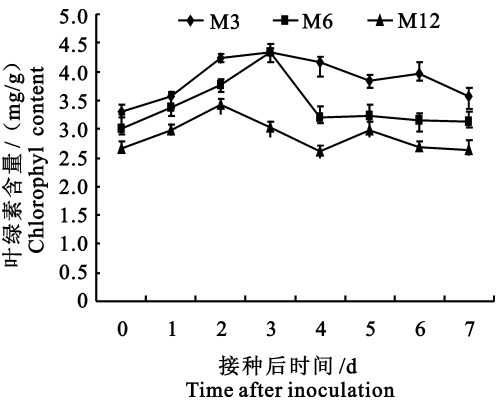


图 1 接种后叶绿素含量的变化

Fig. 1 Changes of chlorophyll content after inoculation

2.2 接菌后可溶性糖含量的变化

从图 2 可以看出,接菌前,抗病自交系可溶性糖含量高于感病自交系;接菌后,各自交系糖含量变化趋于一致,即下降、升高、再下降、再升高;抗病自交系 M3、M6 的第 1 个峰值都出现在接菌后第 5 天,第 7 天出现较大幅度的下降;感病自交系 M12 第 1 个峰值出现在第 3 天,第 5 天出现较大幅度的下降,第 7 天至第 9 天各自交系糖含量逐

渐上升;不同抗性自交系在不同时期糖含量变化不同,在接菌初期,抗病自交系糖含量下降幅度较大,后期上升幅度也较大;感病自交系接菌后糖含量相对稳定,除第 3 天糖含量接近于抗病自交系外,其余时段均低于抗病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前,抗病自交系间可溶性糖含量差异不明显,接菌后第 5 至第 7 天,可溶性糖含量差异呈极显著水平,接菌后第 3 天,抗感自交系间可溶性糖含量差异不明显,其余时段,抗感自交系间可溶性糖含量差异均呈极显著水平。

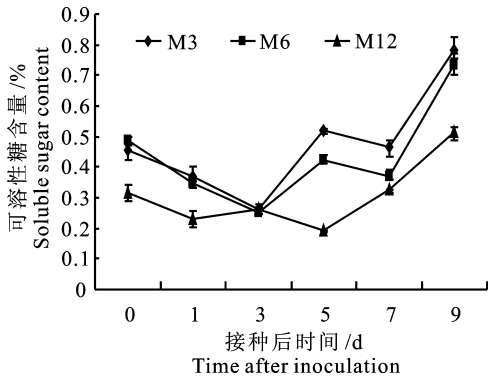


图 2 接种后可溶性糖含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble sugar after inoculation

2.3 接种后可溶性蛋白含量的变化

从图 3 可以看出,接菌前,抗病自交系可溶性蛋白含量高于感病自交系;接菌后,各自交系蛋白含量均有所增加;不同抗性自交系蛋白含量变化不同,抗病自交系 M3、M6 蛋白含量缓慢上升,峰值出现在接菌后第 4 天;感病自交系 M12 蛋白含量上升速度较快,峰值出现在接菌后第 3 天,以后各自交系蛋白含量逐渐降低至正常水平;除第 2 天感病自交系蛋白含量略高于抗病自交系外,其余时期均明显低于抗病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前,抗病自交系间可溶性蛋白含量差异不明显,接菌后第 2 天至第 3 天,可溶性蛋白含量差异呈极显著水平,接菌后第 3 天,抗感自交系间叶绿素含量差异呈显著水平,其余时段均呈极显著水平。

2.4 接种后酶活性的变化

2.4.1 多酚氧化酶(PPO)活性的变化 从图 4 可以看出,接菌前,抗病自交系 PPO 活性显著高于感病自交系;接菌后,各自交系 PPO 活性均有所提高,均在第 6 天达到峰值,抗病自交系 M3、M6 增幅及峰值显著大于感病自交系 M12,第 8 天各自交系 PPO 活性均有不同程度的下降,抗病

自交系 PPO 活性一直高于感病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前后,抗病自交系间 PPO 活性差异呈显著水平,接菌前后,抗感自交系间叶绿素含量差异均呈极显著水平。

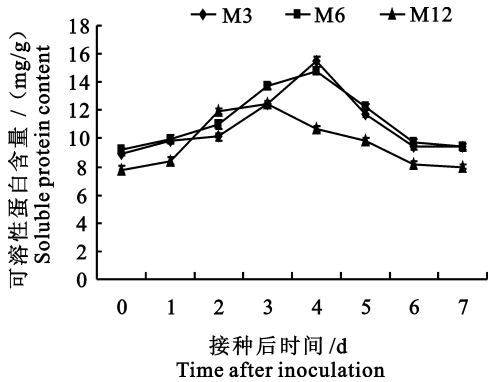


图 3 接种后可溶性蛋白含量的变化

Fig. 3 Changes of soluble protein after inoculation

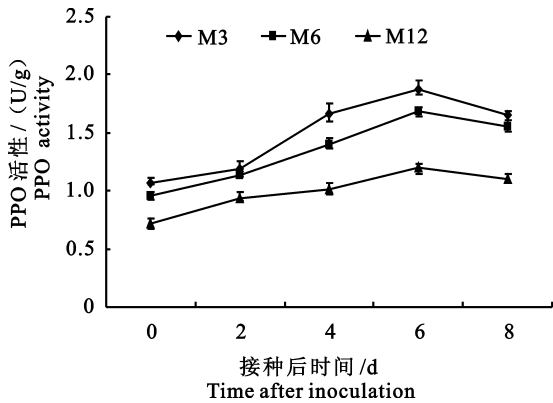


图 4 接种后多酚氧化酶活性的变化

Fig. 4 Changes of PPO activity after inoculation

2.4.2 过氧化物酶(POD)活性的变化 从图 5 可以看出,接菌前,抗病自交系 POD 活性高于感病自交系;接菌后,各自交系 POD 活性均有所上升,不同抗性自交系 POD 活性上升幅度不同,感病自交系 M12 上升幅度较大,增加速度较快,第 4 天和第 6 天感病自交系 M12 POD 活性接近或高于抗病自交系 M3、M6,其余时段均低于抗病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前,抗病自交系间 POD 活性差异不明显,接菌后第 4 天至第 6 天,抗病自交系间 POD 活性差异呈显著水平,接菌前,抗感自交系间 POD 活性差异呈极显著水平,接菌后第 4 至第 8 天,抗感自交系间 POD 活性差异呈显著水平。

2.4.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化 从图 6 可以看出,接菌前,抗病自交系 PAL 活性高

于感病自交系;接菌后,抗病自交系 M3、M6 PAL 活性上升,第 4 天酶活性达到峰值,以后逐渐下降趋于正常;感病自交系 M12 PAL 活性相对稳定,接菌前后抗病自交系酶活性均显著高于感病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前,抗病自交系间 PAL 活性差异均呈显著水平,接菌第 4 至第 6 天,抗病自交系 PAL 活性差异呈极显著水平,接菌前后,抗感自交系间 POD 活性差异均呈极显著水平。

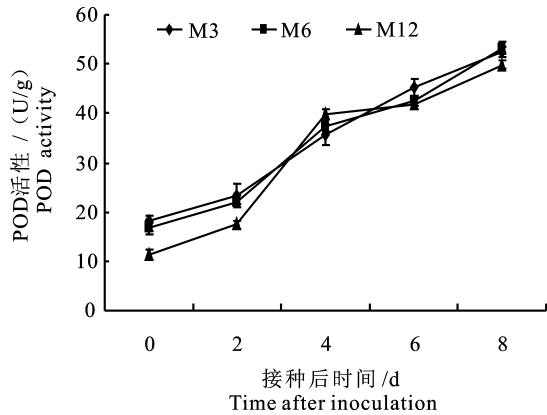


图 5 接种后过氧化物酶活性的变化

Fig. 5 Changes of POD activity after inoculation

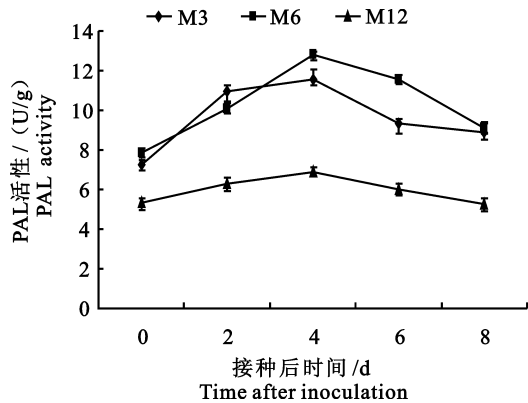


图 6 接种后苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig. 6 Changes of PAL activity after inoculation

2.4.4 过氧化氢酶(CAT)活性的变化 从图 7 可以看出,接菌前,各自交系 CAT 活性差异不明显,抗病自交系 M3、M6 CAT 活性略高于感病自交系 M12;接菌后,抗病自交系 CAT 活性逐渐上升,第 6 天达到峰值,以后逐渐下降趋于正常;感病自交系 CAT 活性在接菌后呈明显的下降趋势,以后逐渐上升,第 6 天达到峰值后开始下降;抗病自交系酶活性一直高于感病自交系。DPS 软件差异性分析:接菌前后,抗病自交系间 CAT 活性差异均呈显著水平。

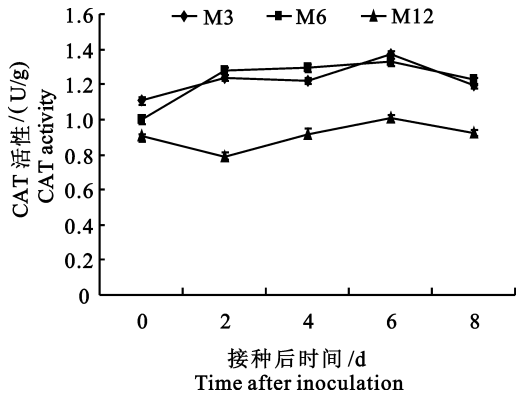


图 7 接种后过氧化氢酶活性的变化

Fig. 7 Changes of CAT activity after inoculation

3 讨论

黄瓜白粉病抗性与叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白含量及防御酶系活性变化密切相关。

接菌后叶绿素含量先上升,抗病自交系上升幅度大于感病自交系。抗病自交系峰值出现在第 3 天,而感病自交系出现在第 2 天,抗病自交系叶绿素含量一直高于感病自交系,叶绿素含量与抗病性存在一定程度的正相关。接菌后,抗病自交系可以通过进一步合成叶绿素来促进光合作用和营养物质的合成,提高植株的抗病性。

骆桂芬等研究认为可溶性糖含量的提高,是植物抗性潜能被激活的结果,是诱导抗性机制的一部分。刘庆元等^[6]对黄瓜霜霉病的研究认为黄瓜叶内可溶性糖含量越高,其抗病性就越强,否则就越弱。刘素萍等^[7]认为糖是病原菌生长繁殖必需的营养物质,糖含量较高是促进植物感病的一个重要因素。本试验接菌前,抗病自交系可溶性糖含量高于感病自交系,接菌后,各自交系可溶性糖含量变化基本一致,均有不同程度的下降,以后逐渐上升。结果表明,病原菌的侵染与繁殖消耗了寄主体内的糖,但是无法说明糖含量的降低与抗病性密切相关。

可溶性蛋白在植物抵御逆境胁迫中起重要作用,蛋白质可激发植物本身的防御反应,诱导植物抗病性。接菌前,抗病自交系可溶性蛋白含量高于感病自交系,感病自交系峰值出现早于抗病自交系,结果表明,感病自交系比抗病自交系对病原菌的侵入较敏感,抗病性与植物对病原菌侵染的反应呈一定的负相关。

病原菌的侵入可诱导植物产生一些生理活性物质,它们参与许多生理代谢过程,如:氧化反应、

木质化反应和对病原物毒素的反应,防御酶系在这些生理代谢中起重要作用。POD 和 CAT 可以清除对细胞膜系统有害的活性氧,POD 直接参与苯丙烷类物质代谢过程,促进木质素和酚类物质的合成^[8]。PPO 活性的增强可以促进酚类物质的产生,酚类物质可以被氧化生成具有更高活性的醌,能有效抑制病原菌的扩展。PAL 是植物抗毒素生物合成的关键酶之一,植物抗毒素是植物抗性反应的重要生理活性物质,它可以防御病原菌的侵入和繁殖。木质素可以使细胞壁增厚,促进木质化进程,形成可阻止病原侵入的生理屏障。木质素的生物合成与莽草酸中间代谢产物密切相关,PAL 是莽草酸途径最重要的酶之一^[9]。试验中,PPO 和 PAL 对白粉病原菌的侵染具有积极作用,在接种病原菌前后,变化规律较为一致,基本可以作为黄瓜白粉病抗性指标。本试验只是初步探讨了不同抗性黄瓜自交系接种白粉病原菌后叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白及部分防御酶的含量及活性变化,对于其他抗病物质如酚类物质、植保素、几丁质酶等还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 沈伟其.测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法[J].植物生理学报,1988(3):62-64.

[2] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:164-169.

[3] 邹芳斌,司龙亨,李新,等. 黄瓜枯萎病抗性与防御系统几种酶活性关系的研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(3):181-184.

[4] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant Physiol, 1992, 98: 1222-1227.

[5] 李 新,司龙亨. 黄瓜不同品种苗期感染枯萎病后几种酶活性的变化[J]. 华北农学报, 2007, 22 (增刊):9-11.

[6] 刘庆元,张 穗,李久禄,等. 黄瓜品种对霜霉病的抗性机理[J]. 华北农学报,1993,8(1):70-75.

[7] 刘素萍,王汝贤,张 荣,等. 根系分泌物中糖和氨基酸对棉花枯萎菌的影响[J]. 西北农业大学学报,1998,26(6): 30-35.

[8] 王惠哲,刘淑菊,霍振荣,等. 黄瓜感染白粉病菌后的生理变化[J]. 华北农学报,2006,21(1): 105-109.

[9] 曾永三,王振中. 苯丙氨酸解氨酶在植物抗病反应中的应用[J]. 仲恺农业技术学院学报,1999,12(3):56-65.

[10] 董毅敏,徐建华,郭季芳. 抗病和感病黄瓜品种感染白粉病菌后几种酶活性的变化[J]. 植物学报,1990,32(2):160-164.

[11] 魏国强,钱琼秋,朱祝军. 黄瓜白粉病抗性及生理机制的研究[J]. 华北农学报,2004,19(2):84-86.

[12] 李明玉,曹辰兴,于喜艳. 低温锻炼对冷胁迫下黄瓜幼苗保护性酶的影响[J]. 西北农业学报,2006,15(1):160-164.