

猕猴桃品种对细菌性溃疡病的抗性机制

李 森¹ 檀根甲^{1*} 李 瑶² 薛 莲¹

(1. 安徽农业大学植物保护系, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学园艺系, 合肥 230036)

摘要: 研究了安徽省猕猴桃主栽品种金魁(高抗)、早鲜(中抗)、魁蜜(抗病)、华美2号(感病)、秦美(中感)和金丰(高感)对细菌性溃疡病的抗性机制。结果表明:形态结构抗性方面,感病品种的皮孔密度和长度及气孔密度、长度和宽度都明显高于抗病品种,抗、感品种间皮孔、气孔的排列方式也存在一定差异。相关分析表明,皮孔密度和长度及气孔密度、长度和宽度与品种发病率都有较高的相关性,尤其以皮孔长度和气孔长度相关性最高, r 分别为0.9278和0.9794;生理生化抗性方面,品种未感染溃疡病菌前,芽中的POD酶活性与品种抗性存在规律性不强,一年生枝条、叶片中的POD酶活性与品种抗性有密切关系。品种感染溃疡病菌后,POD酶活性均升高,但抗病品种中酶活提高倍数高于感病品种。一年生枝条上病斑越大,POD酶活性越高。POD同工酶谱带表现出与酶活相一致的规律。

关键词: 猕猴桃; 品种; 细菌性溃疡病; 抗性机制

猕猴桃原产于我国,风味独特,特别是Vc含量丰富,享有“果中之王”的美称。但猕猴桃溃疡病却日渐严重^[1]。该病是由假单胞杆菌 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* 引起的一种细菌性病害^[2],于1980年在美国加利福尼亚州和日本神户静冈县首次发现,我国湖南东山峰农场1986年发现该病,安徽省岳西县主簿镇双丰猕猴桃场也于1990年发现有植株感染溃疡病,继而大面积死亡。猕猴桃溃疡病来势凶猛,具有爆发性、毁灭性等特点,损失相当严重,极大地挫伤了果农的种植积极性。因此,对猕猴桃抗细菌性溃疡病的研究具有重要的经济和社会意义。

栽培抗性品种是控制猕猴桃溃疡病的关键措施^[3]。作者从形态结构和生理生化两方面研究了安徽省猕猴桃主栽品种对细菌性溃疡病的抗性机制。溃疡病菌为弱寄生菌,主要从枝干上的皮孔和叶片上的气孔、水孔及伤口侵入^[4],皮孔、气孔的数目、大小及排列方式与品种抗性有关。植物病原细菌侵入植物体后可引起寄主植物体内发生复杂的生理生化变化,与植物抗病性有关的酶类如过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)是许多学者研究的重点。对猕猴桃受溃疡病菌感染后

POD、PPO活性的变化及其同工酶谱带的变化,国内很少有报道。作者分别采用冰冻切片和火胶棉印膜法显微观察皮孔、气孔的结构特征,用分光光度法测定酶活性,用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析同工酶,以期快速准确地进行品种抗性鉴定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在海拔高度为720m的岳西县主簿镇猕猴桃良种园选择金魁、早鲜、华美2号、秦美、金丰、魁蜜等6个主栽品种及两种雄株品系中华软和美味硬,于猕猴桃萌芽伤流期(3月上旬)取健康的一年生枝条、幼芽,展叶孕蕾期(4月下旬)取健康的和发病的一年生枝条、叶片作为供试材料。同时于萌芽伤流期在安徽农业大学园艺场采取金魁、金丰、海沃德的一年生枝条作低海拔对照。

1.2 方法

1.2.1 不同品种的形态结构观测

枝条组织结构的制片与皮孔观测:取一年生枝条,用FAA固定液固定,用冰冻切片法切片^[5],切片厚度为15~20 μ m,经苏木精-番红O双重

基金项目:安徽省重点科研项目及安徽省教育厅自然科学研究项目(95-农-18)资助

作者简介:李森,男,1978年生,中国科学院在读博士研究生(E-mail: ahlímiao@163.com)

* 通讯作者(E-mail: tgj63@etang.com); 收稿日期:2003-10-23

染色,用香脂封片。在光学显微镜下观察皮孔,用显微照相机(Olympus)拍照,并用显微测微尺测量皮孔长度,结合肉眼观测皮孔密度、排列方式。每个品种测20个皮孔,求平均值。并分析皮孔与品种抗性的相关性。

叶片组织结构的制片与气孔观测:选新梢第3叶,在田间用火胶棉印膜法固定气孔^[6],室内显微观测气孔密度、长度、宽度和排列方式。每个品种测50个气孔,求平均值。并分析气孔与品种抗性的相关性。

1.2.2 不同品种的生理生化测定

酶液提取:分别切取枝条韧皮部、幼芽或叶片叶肉,称鲜样1g,加3mL提取液、少许1%PVP和少量石英砂,冰浴研磨至匀浆,于4℃以5000 r/min离心20min,取上清液冷冻备用。提取POD用0.05 mol/L pH8.0 Tris-HCl缓冲液,PPO用0.05mol/L pH7.0 磷酸缓冲液。

酶活性测定:POD活性的测定,按李靖的方法^[7]进行,并略有修改。在小试管中依次加入0.2mol/L pH5.0 醋酸缓冲液1.95mL、0.1%愈创木酚1mL、酶液20μL、0.08%过氧化氢溶液1mL,而对照即将H₂O₂改为1mL蒸馏水。从加入H₂O₂的那一刻开始计时,室温下反应1min后,测OD₄₇₀。PPO活性的测定,在小试管中依次加入0.02mol/L 邻苯二酚溶液1.5mL,0.05mol/L

pH6.8 磷酸缓冲液1.5mL,酶液10μL;另取一小试管,加前两种溶液,不加酶液,作为对照。在30℃恒温水浴中反应2min,测OD₃₉₈。用755B紫外可见分光光度计测定,酶活单位=ΔOD值/g鲜重/min^[8]。

POD同工酶电泳:采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术^[9]。用5%的分离胶和2.5%的浓缩胶,电极缓冲液为pH8.3 Tris-Gly,加样量15μL,用0.1%溴酚蓝作指示剂。在4℃下电泳,上层胶电压150V,下层胶电压260V,约6h。取出胶片用改良的联苯胺溶液^[10]染色5~10min,显带后洗净脱色,保存在3%醋酸中固定,拍照。计算酶带的相对迁移率^[11]:相对迁移率(R_f)=(酶带移动距离÷脱色后胶长)×(染色前胶长÷指示剂移动距离)。

2 结果与分析

2.1 不同品种对细菌性溃疡病的抗性

比较了前人及笔者实际调查的病情资料^[3,12],金魁高度抗病,属高抗品种,早鲜中度抗病,属中抗品种,魁蜜中度感病,金丰高度感病,属高感品种(表1)。实践经验表明,栽培抗病品种是控制猕猴桃溃疡病的关键措施。同时,这为进一步深入研究其抗病机制提供理论依据。

表 1 4 个品种对细菌性溃疡病的抗性

Table 1 Four diferent cultivars resistance to kiwifruit bacterial canker

品种 Cultivars	调查总株数		发病株数		发病率(%)		平均发病率 (%)	抗级 Resistant level
	Investigate total plant number		Diseased plant number		Diseased plant incidence			
	萌芽期 Sprout stage	孕蕾期 Bud stage	萌芽期 Sprout stage	孕蕾期 Bud stage	萌芽期 Sprout stage	孕蕾期 Bud stage	Average diseased plant incidence	
金魁 Jinkui	15	138	0	0	0.00	0.00	0.00	HR
早鲜 Zaoxian	38	133	4	27	10.50	20.30	15.40	MR
魁蜜 Kuimi	11	56	7	3	63.60	5.35	34.48	MS
金丰 Jinfeng	1471	3177	1469	1275	99.90	40.30	70.02	HS

2.2 品种形态结构抗性

由表2和表3可见,抗、感品种间皮孔密度、皮孔长度存在一定差异。高感品种金丰的皮孔密度和皮孔长度最大,魁蜜、早鲜次之,高抗品种金魁的皮孔密度和皮孔长度最小。不同品种皮孔的排列方式也有所差异,皮孔分布密集、上下排列连成一线的品种容易感病。不同生育期,皮孔变化不大,密度、长度略有增长。同时,相关分析表明,皮孔密度、皮孔长度与品种发病率均有较高的相

关性,*r*分别为0.8978和0.9278,皮孔长度与品种发病率相关性更高。

2.3 品种生理生化抗性

2.3.1 酶活性与品种抗性的关系

不同生育期猕猴桃品种POD酶活性变化:从表4可以看出,在萌芽伤流期,即尚未自然发病前,各个猕猴桃品种一年生健枝及健芽中POD活性存在一定的差异。抗病品种一年生健枝的酶活性明显低于感病品种,高抗品种金魁与高感品种

表 2 萌芽伤流期 4 个猕猴桃品种枝条皮孔形态特征与溃疡病的关系

Table 2 The relations between density and length of branch lenticel of the annual twig and 4 kiwifruit cultivars resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* in sprout stage

品种 Cultivars	皮孔密度(个/cm ²) Density of branch lenticel	皮孔长度(μm) Length of branch lenticel	排列方式 Array mode
金丰 Jinfeng	13.70 ± 1.38 a	70.70 ± 3.94 a	细长,较大凸起,分布密集,不连成一线 Branch lenticel is slight, gibbose, distributed densely, don't link line one
魁蜜 Kuimi	6.30 ± 0.83 b	62.30 ± 1.55 b	长圆形,分布疏密相间,有的连成一线 Branch lenticel is long circular, density is alternate, some link line one
早鲜 Zaoxian	6.00 ± 1.20 b	60.00 ± 1.45 b	长梭形,上下排列成不连续线 Branch lenticel is long shuttle-like, arranging into a discontinuous line from head to foot
金魁 Jinkui	5.60 ± 0.51 b	52.60 ± 1.48 c	细小,分布稀疏,不连成一线 Branch lenticel is exiguous, it is sparse to be distributed, don't link line one

注:表内数值为 20 次重复的平均值,数据后字母相同者为 5% 水平上差异不显著,下同。Note: The numerical value in the table is for average of 20 times, after data the same letter is not differential notability at 5% level, *r* is correlation coefficient (see the next table), the following is the same.

金丰酶活性差异较显著。而幼芽中酶活性规律性不是很强。所有品种枝条中 POD 酶活性都低于幼芽。在展叶孕蕾期与挂果成熟期,不同抗性猕猴桃品种之间枝条与叶片中 POD 活性存在一定的差异。枝条与叶片中的 POD 活性变化规律相同,抗病品种健枝、健叶 POD 酶活性明显低于感病品种,雄株 POD 酶活性变化规律同萌芽期。自然感染溃疡病菌后,感抗品种枝条与叶片中 POD 酶活性都升高,且抗病品种 POD 酶活性增加的更明显,增幅较大,而感病品种增幅较小。所有品种枝条中的 POD 酶活性都低于叶片,但发病后枝条与叶片中 POD 酶活性增加量相差无几。随着病害由发病始期进入发病盛期,抗感病品种 POD 活

性也随着发病程度的加重而升高。这与萌芽期枝条及叶片中的 POD 活性变化是一致的。相比于萌芽期与展叶期,挂果期枝条、叶片中的 POD 活性降低了。

不同生境猕猴桃品种 POD 活性比较:如图 1 所示,在萌芽伤流期、展叶孕蕾期和挂果成熟期,不同生境下猕猴桃品种之间 POD 酶活性也存在显著差异。不同抗性猕猴桃品种枝条、幼芽与叶片中的 POD 酶活性变化规律相同,都是抗病品种 POD 酶活性始终低于感病品种。不同生态地区同一猕猴桃品种体内 POD 酶活性不同。高海拔的岳西,其金魁、金丰品种体内 POD 酶活性相对于低海拔的合肥要高,且枝条中的 POD 酶活性低

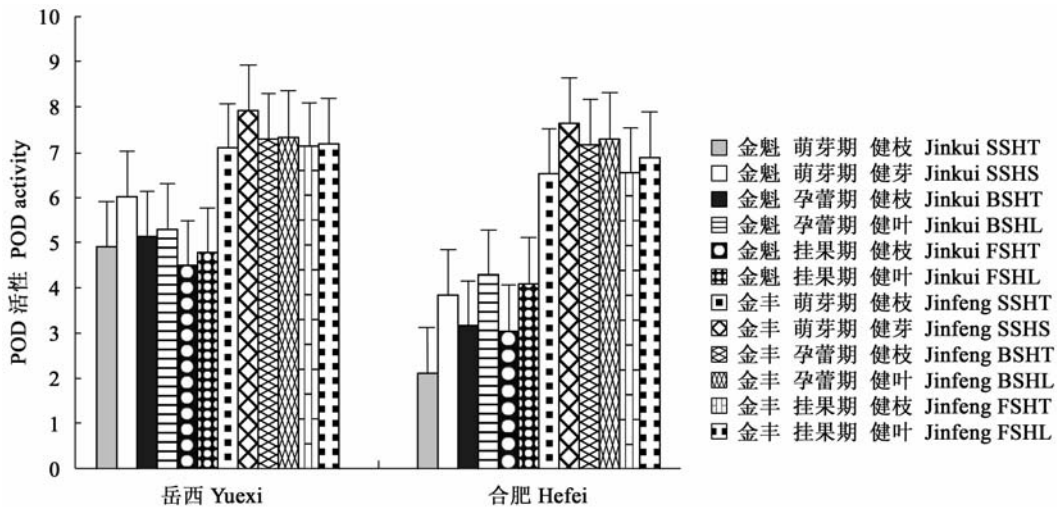


图 1 不同生境 POD 活性的比较

Fig. 1 The comparison of POD activity of growth stage in different area

Note: S-sprout, B-bud, F-fruited, H-healthy, T-twig, L-lamina.

于幼芽。海沃德品种体内 POD 酶活性居中。相比于萌芽期,展叶期枝条中的 POD 活性都上升,相比于萌芽期、展叶期,挂果期枝条与叶片中的 POD 活性降低。

从图 2 中可以看出,展叶孕蕾期不同品种一年生枝条 POD 活性变化存在差异。抗感品种一

年生枝条中的酶活性都随着病斑的增大而升高,但两者升高的幅度不同。抗病品种早鲜的病斑小,酶活性增幅反而大,而感病品种金丰的病斑虽大,但酶活性增加的幅度却小。这进一步说明病菌的侵入诱导了 POD 酶活性的提高,且诱导早鲜的酶活性程度大,从而表现较为抗病。

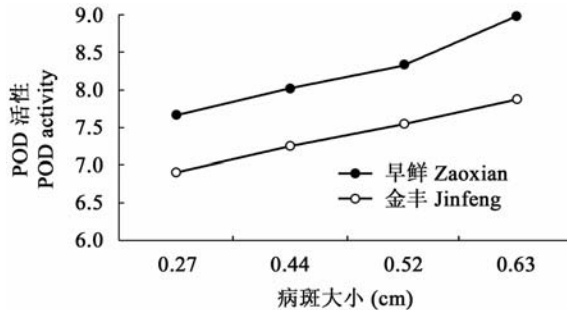


图 2 展叶孕蕾期一年生枝条不同病斑大小 POD 活性的比较

Fig. 2 The comparison of POD activity of different disease spots of the annual twig in bud period

2.3.2 POD 同工酶谱带与品种抗性的关系

POD 同工酶谱带变化表现出与酶活性相似的规律。自然感染溃疡病前后抗病品系与感病品系的过氧化物酶同工酶特征谱带与活性的变化有一定差异。未感染溃疡病菌前,即处于萌芽期时,抗感品系枝条、叶片均有 2 条酶带,但感病品种酶带颜色深且粗,而抗病品种酶带颜色浅且细,叶片酶带颜色深于枝条。自然发病后,即处于展叶孕蕾期,抗病品系金魁、早鲜、魁蜜枝条、叶片 POD 同工酶活性增强,并且有新谱带出现,感病品系金丰、秦美、华美 2 号枝条、叶片虽也有新酶带出现,但同工酶活性低于抗性品系。抗感病品系谱带数都增加,分别为 4 和 3 条,且抗病品种酶谱带粗色深活性较强。此外抗病品系金魁、早鲜发病后多出两条新酶带,可能与金魁、早鲜对溃疡病抗病相关。可以看出,感病品种仅靠增加 POD 各同工酶的活性来增强酶的总活性,而抗病品种不但靠增加各同工酶的活性,而且还被诱导产生 2 条新的同工酶谱带。因此,新酶带出现的数目及其强度可作为猕猴桃植株抗病性筛选的生化指标之一。

3 讨论

试验表明,形态结构抗性为寄主植物固有的抗病性,主要抵抗病菌侵入。对取材部位做酶活性分析进行品种抗性鉴定很重要。抗性品种 POD 酶活性较低,可能是抗性品种体内绿原酸含量较高抑制了酶活性^[13],感病前猕猴桃以绿原酸

杀菌为主。POD、PPO 酶主要参与酚类物质的氧化、缩合和木质素的合成^[14],植物感病后,同抗病性有关物质的代谢加强了,POD、PPO 酶活性增强,加速了木质化作用,限制了病菌的扩展,产生过敏反应^[15]。POD 同工酶谱带变化规律与酶活性表现一致,酶活增加除了原有谱带酶活性增加外,还有出现新的同工酶的缘故。由此可见,生理生化抗性为诱导的抗病性,主要限制病菌的扩展。植物病原菌侵入植物体后,可引起寄主植物体内发生复杂的生理生化变化,要进一步弄清其机制,其他抗性酶类如 PAL 也值得研究。

抗病品种的枝条、叶片在自然感染病菌后过氧化物酶活性上升,可能有利于木质素的合成,而细胞壁的高度木质化对病菌的侵染和扩展有一定的限制作用。感病品种的枝条与叶片发病后酶活性虽然也上升,但上升不多,这可能不利于木质素的合成,致使对溃疡病菌的限制能力减弱而容易感病。从而,健康枝条、叶片中的过氧化物酶活性及发病后的酶活性及其增加幅度可以作为猕猴桃对溃疡病抗性鉴定的生化指标之一。品种抗性包括形态结构、生理生化和分子水平三方面。本研究结果表明,猕猴桃对细菌性溃疡病的抗性是形态结构抗性和生理生化抗性共同作用的结果,枝干上皮孔、叶片上气孔的数目、大小及排列方式以及一年生枝条叶片中的 POD 酶活性和同工酶谱的表现均与品种田间抗病性有明显相关规律,可以作为鉴定猕猴桃品种抗溃疡病的较为可靠的

指标。

本试验只选择了不同品种、海拔高度、生育期的一年生枝条、叶片作为试材,而没有将主枝、多年生枝条、花蕾、枝干等材料作为试验对象,也没有能够从同一地区不同海拔高度、不同坡向、不同树龄、枝龄的角度进行研究,这对于抗病性方面研究可能有一定局限性。本试验采取实际采集园间自然发病的猕猴桃植株来做试验,导致生理生化指标的测定时间较为粗放。因此,还有待于进一步细化指标的测定时间,探索这些防御酶类基因的表达状况、作用及其价值。同时比较抗病品种与感病品种对溃疡病菌侵染所产生的防御反应特点,可能更有助于揭示猕猴桃品种对溃疡病的抗性机制。

参考文献 (References)

- 1 方炎祖,魏凯. 猕猴桃病虫害及其防治. 北京:科学普及出版社,1992
- 2 承河元,李瑶,万嗣堃,等. 安徽省猕猴桃溃疡病菌鉴定. 安徽农业大学学报,1995,22(3):219-223
- 3 王振荣,高同春,顾江涛,等. 猕猴桃溃疡病防治研究. 安徽农业科学. 1998,26(4):349-351
- 4 王连荣. 园艺植物病理学. 北京:中国农业出版社,2000
- 5 薛应龙. 植物生理学实验手册. 上海:上海科学技术出版社,1985
- 6 方中达. 植病研究方法. 北京:中国农业出版社,1996
- 7 李靖,利容千,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化. 植物病理学报,1991,21(4):277-283
- 8 李保聚,李风云. 黄瓜不同抗性品种感染黑星病菌后过氧化物酶和多酚氧化酶的变化. 中国农业科学,1998,31(1):86-88
- 9 张启元. 现代生物学实验技术. 北京:北京师范大学出版社,1992,140-154
- 10 何忠效,张树政. 电泳. 北京:科学出版社,1999,284-286
- 11 李建武. 生物化学实验方法. 北京:北京大学出版社,1999
- 12 李瑶,承河元,方书苗,等. 猕猴桃溃疡病流行的生态因子及药剂对病菌的抑菌作用. 应用生态学报,2001,12(3):359-362
- 13 徐朗莱,叶茂炳,徐雍皋,等. 过氧化物酶及其同工酶与小麦抗赤霉病性的关系. 植物病理学报,1991,21(4):285-290
- 14 Tenhaken R, Levine A, Brisson L F, *et al.* Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 4158-4163
- 15 Ryals J, Lawton K, Delaney T P, *et al.* Signal transduction in systemic acquired resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 4202-4205

Resistance mechanism of kiwifruit cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*

LI Miao¹ TAN Gen-jia¹ LI Yao² XUE Lian¹

(1. Department of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. Department of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to investigate resistance mechanism of kiwifruit varieties to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*, experiments were conducted with the main cultivars of kiwifruits, Jinkui (HR), Zaoxian (MR), Kuimi (R), Qinmei (S), Huamei 2 (MS), and Jinfeng (HS), in Anhui Province. The morphological results showed that branch skin hole density, length and blade stoma density, length and width of susceptible varieties were larger than those of resistant varieties. Meanwhile, they were in correlation with disease incidence. There were differences in skin hole and stoma lining situation among the varieties, too. The physiological and biochemistry results showed that POD activity in bud was not much regular with different varieties, while POD activities in branch of one year and leaf were significantly correlated with different varieties preinfection. POD activity ascended both in susceptible and resistant varieties postinfection, but it increased faster in resistant varieties than in susceptible varieties. And the bigger the spot was, the higher POD activity was. The changes of POD isozyme were similar to those of POD activity.

Key words: Kiwifruit; cultivars; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*; resistance mechanism