

杨德翠. 牡丹-枝孢霉互作过程中牡丹抗氧化酶活性的变化[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):228-230.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.075

# 牡丹-枝孢霉互作过程中牡丹抗氧化酶活性的变化

杨德翠

(青岛农业大学生命科学学院/山东省高校植物生物技术重点实验室,山东青岛 266109)

**摘要:**牡丹红斑病是牡丹发生最为普遍的危害之一。本试验选用抗性牡丹品种鲁荷红和易感牡丹品种赵粉作为材料,研究牡丹经枝孢霉菌侵染互作过程中不同抗性牡丹品种抗氧化酶活性的变化。试验发现,鲁荷红与赵粉相比,发病较轻。二者的抗氧化酶(SOD、CAT、POD、PPO)活性变化趋势相似,均为先升高后下降,但在不同的品种中抗氧化酶活性变化的幅度和时间不同。在鲁荷红叶内抗氧化酶活性高,处理后上升快,下降缓慢,而在赵粉中则相反。特别是 POD 活性,鲁荷红在 48 h 达到高峰,比对照上升 331.2%;而赵粉在 72 h 达到最高,比对照升高 225.5%。以上结果表明,SOD、POD、CAT 和 PPO 活性变化大小可作为衡量牡丹对红斑病抗性强弱的指标。

**关键词:**牡丹;牡丹红斑病;抗氧化酶;牡丹枝孢霉

**中图分类号:** S685.110.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0228-02

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)是我国十大传统名花之一,被誉为“花中之王”。牡丹不但欣赏价值高,还是名贵的中药材。牡丹籽油因其营养丰富,又有医疗保健作用,被专家称为“世界上最好的油”<sup>[1]</sup>。因此,牡丹栽培面积不断增加。随着栽培面积的扩大,其病害也逐年加重。据调查,国内牡丹病害有 20 多种<sup>[2]</sup>,其中牡丹红斑病,也叫霉病、轮斑病,是牡丹上发生最为普遍的危害之一,由牡丹枝孢霉(*Cladosporium paeoniae* Pass.)侵染引起<sup>[3]</sup>,主要危害部位为叶片。受害牡丹植株长势衰弱,花色衰退,严重时甚至死亡,引起牡丹品质差、苗木产量低,造成了重大经济损失,严重影响了牡丹产业的健康发展。通过调查发现牡丹不同品种间抗病性存在很大差异<sup>[3-4]</sup>,开发利用抗病品种是实现病害可持续控制的有效途径之一。现在研究多集中于病原菌的分离和鉴定,对于牡丹受病原菌侵染后的生理生化变化研究较少<sup>[5-6]</sup>,而研究牡丹与病原菌互作过程中生理生化变化,最易揭示牡丹的抗病本质。本试验对不同抗病性的牡丹品种在牡丹-牡丹枝孢霉互作过程中的抗氧化酶活性变化进行研究,为抗病品种的选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料的培养及处理

本试验选用抗性牡丹品种鲁荷红和易感品种赵粉,在 2013 年秋季从山东菏泽购入,栽入花盆(45 cm × 32 cm)中,埋入大田越冬。2014 年 3 月中旬移入温室,温室温度 20 ~ 30 ℃。常规浇水、施肥管理,植株生长良好。

牡丹枝孢霉为笔者所在实验室从病叶上分离并鉴定的菌种。在 PDA 培养基上培养,25 ℃ 黑暗培养 10 d,待菌落直径约 6 cm 时,用毛刷将病原孢子刷下,用无菌水配制成 3.5 ×

10<sup>6</sup> 个/mL 的孢子悬浮液。选取长势一致的植株,采用无创伤接种,用喷雾法将菌液喷至叶片的正反面至滴水为止。参照吴玉柱等的方法<sup>[7]</sup>,微型喷雾器喷雾保湿 3 d,对照用无菌水喷施。分别于接种病原菌后的 0 h(处理前)、12、24、48、72、120 h 取样,于 09:00 取材取牡丹枝条倒 2、3 叶,进行相关生理指标的测定。

### 1.2 生理指标的测定方法

超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化物酶(POD)活性的测定均参照刘家尧等的方法<sup>[8]</sup>;过氧化氢酶(CAT)和多酚氧化酶(PPO)活性测定均参照郝再彬等的方法<sup>[9]</sup>。

### 1.3 发病情况统计方法

在病原菌处理 10 d 后统计牡丹发病情况,染病率 = 发病叶片数/调查的总叶片数 × 100%,以染病率来表示不同品种的抗病情况。

数据使用 Excel 处理,用 SAS 8.1 数据处理软件进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同牡丹品种的发病情况

赵粉、鲁荷红喷施病原菌后,均有病斑的出现,但出现的时间不同,赵粉 3 d 有小斑点出现,而鲁荷红 5 d 才开始出现小斑点。10 d 后统计发病情况(表 1),可知发病程度有显著差异,赵粉的发病率 69.0%,而鲁荷红为 39.2%,说明鲁荷红对红斑病的抗性高于赵粉。

表 1 不同牡丹抗性品种发病情况统计

牡丹品种	感病叶片(张)	总叶片(张)	发病率(%)
赵粉	126	182	69.0
鲁荷红	67	171	39.2

### 2.2 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 SOD 活性变化

SOD 是在植物活性氧(ROS)清除系统中第一个发挥重要作用的抗氧化酶,能将 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 歧化成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>。从图 1 看出,2 个牡丹品种经病原菌侵染后 SOD 活性先上升后下降,变

收稿日期:2014-11-11

基金项目:青岛农业大学高层次人才启动基金(编号:631413)。

作者简介:杨德翠(1974—),女,山东曹县人,博士,从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail:decuiyang@163.com。

化的时间和幅度不同。鲁荷红处理后在 24 h 有高峰的出现, 比对照提高 45.1%, 随后开始下降, 但仍高于对照。而赵粉在 48 h 达到高峰, 比对照提高 38.7%, 之后又迅速下降。

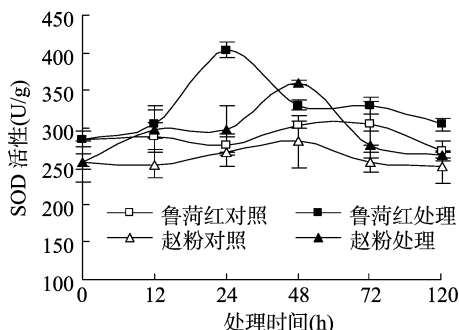


图1 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 SOD 活性变化

### 2.3 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 CAT 活性变化

在生物体内 CAT 负责清除细胞内的过氧化氢, 使之分解生成氧和水, 防止膜脂过氧化, 使细胞免遭过氧化氢的毒害。从图 2 可以看出, 不同品种牡丹-枝孢霉处理后, CAT 活性变化一致, 均在 24 h 到达最高峰, 鲁荷红、赵粉分别上升 81.7% 和 88.3%, 随后下降, 但赵粉的下降速度比鲁荷红要快, 降低了对  $H_2O_2$  的清除能力。

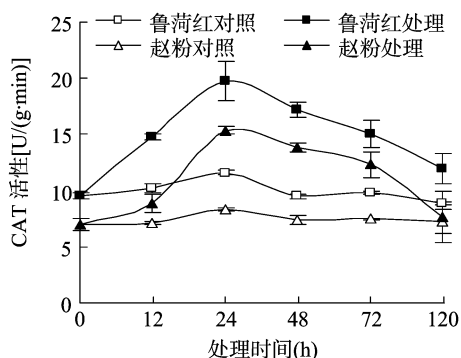


图2 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 CAT 活性变化

### 2.4 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 POD 活性变化

POD 是逆境条件下的关键防御酶, 能清除自由基, 特别是在植物的抗病中发挥作用。由图 3 可知, 鲁荷红牡丹枝孢霉处理后, POD 活性在 24 h 时显著升高, 在 48 h 时达到最大值, 比对照上升 331.2%; 随后缓慢下降。赵粉在 72 h 达到最高, 比对照升高 225.5%。

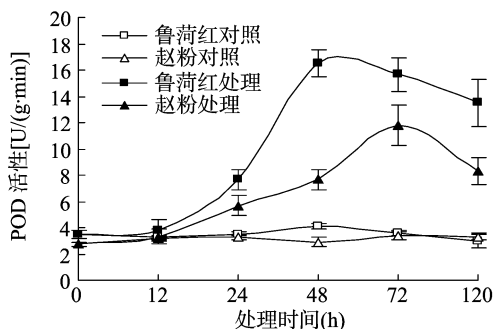


图3 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 POD 活性变化

### 2.5 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 PPO 活性变化

PPO 参与了木质素前体的聚合作用, 与植物抗病性密切

相关。从图 4 可以看出, 鲁荷红经病原菌处理后, PPO 活性不断升高, 在 120 h 稍有下降; 而赵粉处理后, PPO 活性升高缓慢, 在 72 h 后迅速下降。

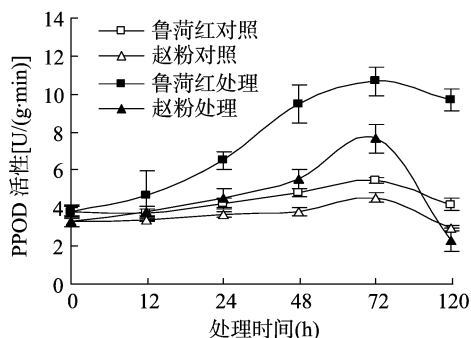


图4 牡丹-枝孢霉互作过程中叶片 PPO 活性变化

## 3 讨论

病原和寄主植物在相互作用的过程中, 植物表现出相当大的潜力来防御外来病原物的侵袭, 进而产生一系列的生理生化反应<sup>[10]</sup>, 其中植物生理生化的变化一直是抗病性研究的热点问题, 但牡丹受病原菌感染后的生理变化研究较少。本研究中无论是抗性品种鲁荷红还是感性品种赵粉, 在枝孢霉菌处理后抗氧化酶活性的变化趋势基本相似, 均表现出先上升后下降的趋势, 但不同的酶类及不同品种上升到高峰的时间和幅度不同。鲁荷红中的 SOD 活性在 24 h 出现高峰, 随后下降, 赵粉在 48 h 出现高峰, 但鲁荷红中 SOD 活性显著高于赵粉。对于 POD 活性, 鲁荷红在 48 h 出现高峰, 而赵粉在 72 h 有高峰的出现, 活性远高于赵粉。对于 CAT 和 PPO 活性, 鲁荷红和赵粉高峰的时间相同, 但鲁荷红升高的幅度大于赵粉, 而赵粉活性的下降大于鲁荷红。总的来看, 抗性品种鲁荷红抗氧化酶活性上升快, 活性高, 下降缓慢, 而感病品种赵粉酶活性上升稍慢一些, 上升幅度低, 相对于鲁荷红下降较快。由于鲁荷红的发病率低于赵粉, 这说明抗病性的强弱与酶活性的高低有密切的关系。

牡丹受到柱孢菌的侵染后 SOD 活性也有升高再下降的趋势<sup>[6]</sup>, 接种 *Fusarium* spp. 和 *Rhizoctonia* 后, 具有较强抗病性的水稻秧苗 SOD 活性明显上升, 高峰出现较早<sup>[11]</sup>。近年来, 多项研究表明 CAT 参与了植物的抗病性, 抗病的可能机制还不太清楚, 可能在生物侵染的早期, 将  $H_2O_2$  分解为  $O_2$ , 触发苯甲酸, 生成水杨酸, 启动了植物的系统抗性 (systemic acquired resistance, SAR), 增强抗病性。POD 酶催化合成的木质素是细胞壁的主要成分, 是抵抗病原菌入侵的重要屏障<sup>[12]</sup>, 木质素的含量可能与抗病性有关<sup>[15]</sup>。本试验中, 2 个牡丹品种的酶活性差异非常明显, 抗性品种 POD 活性变化比感病品种活性高, 与王凤敏等研究大白菜感染甘蓝链格孢的结果<sup>[13]</sup>相似。有研究发现, 真菌感染后植株 PPO 活性增强, 与抗病密切相关<sup>[14]</sup>, 且抗性品系的总酚量和 PPO 活性都要比感性品系高。

以上结果表明, 牡丹-枝孢霉抗性的大小与抗氧化酶活性密切相关, SOD、POD、CAT 和 PPO 活性变化大小均可作为衡量牡丹抗性大小指标的依据, 可为培育抗病牡丹新品种提供理论指导。

郭爱华. 非洲紫罗兰原生质体制备条件优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 230–232.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.076

# 非洲紫罗兰原生质体制备条件优化

郭爱华

(吕梁学院生命科学系, 山西吕梁 033000)

**摘要:**以苗龄为 15 d 的非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha* Wendl)幼苗顶端 2 片完全伸展的叶片为材料,从酶浓度、酶配比、时间、温度、渗透压等方面设置试验,研究制备非洲紫罗兰原生质体的条件,最终得出 1 组制备其原生质体的良好条件,即酶组合为 1.5% 纤维素酶 + 0.5% 果胶酶,酶解时间为 3 h,酶液渗透压即甘露醇浓度为 0.6 mol/L,温度为 25 ℃,在此条件下可分离出大量有活力的原生质体。

**关键词:**非洲紫罗兰;原生质体;制备;优化

**中图分类号:** S681.203 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0230-03

非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha* Wendl),原产于东非热带地区,多年生草本植物,苦苣苔科非洲堇属,别名非洲堇。其植株是适合室内盆栽的优良花卉,花色斑斓、玲珑小巧、四季开花。20 世纪 80 年代中国才从欧美地区引种试管苗。目前,仅少数园艺公司拥有小批量生产技术,国内非洲紫罗兰在品种创新、生产规模化、基因多样性及稳定性等研究方面都受到较大制约。随着经济飞速发展,人民生活水平和品味的提高,人们对居家环境的要求也显著增高,非洲紫罗兰作为兼具优良观赏功能与环境净化功能的花卉品种,备受消费者欢迎,市场前景广阔<sup>[1]</sup>。

原生质体是除去细胞壁的植物细胞,其细胞膜较薄,适用于生物工程,是创造新品种和进行基因遗传改良的理想材料,是在细胞水平上进行植物人工育种和栽培体系的有效方法,

是提高产业化、规模化水平的有效途径<sup>[1-3]</sup>。探讨非洲紫罗兰原生质体的制备,为进一步研究其基因表达及培育新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

非洲紫罗兰(混色)种子购于北京鑫农丰农业技术研究所。

### 1.2 幼苗培养及试验方法

1.2.1 幼苗培养 将种子用 0.1% 氯化汞表面消毒后置于培养皿中水培 15 d,剪取无菌苗顶端 2 片完全伸展的叶片,蒸馏水冲洗干净,用双面刀片将其切成 1~2 mm 的小碎块。

1.2.2 标准液的配制 非洲紫罗兰幼苗培养标准液配制见表 1。

1.2.3 原生质体的制备 纤维素酶(cellulase R-10)浓度有 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%,果胶酶(pectinase Y-23)浓度有 0%、0.5%、1.5%、2.0%,分别制成 16 种不同浓度的混合酶溶解于配有 0.4 mol/L 甘露醇的标准液中,将 pH 值调至 5.6。酶解非洲紫罗兰幼苗以确定纤维素酶和果胶酶对原生

收稿日期:2015-04-20

基金项目:山西省大学生创新创业训练项目(编号:2014466);吕梁学院大学生创新创业训练重点项目(编号:CXCYZD201410)。

作者简介:郭爱华(1983—),女,硕士,助教,主要研究方向为植物细胞生物学。E-mail:guoaihua2000@163.com。

## 参考文献:

- [1]周海梅,马锦琦,苗春雨,等.牡丹籽油的理化指标和脂肪酸成分分析[J].中国油脂,2009,34(7):72-74.
- [2]李丽.山东地区芍药病害调查及主要真菌性病害的病原鉴定[D].泰安:山东农业大学,2014:12-14.
- [3]吴玉柱,季延平,刘 毅,等.牡丹红斑病的研究[J].林业科学,2005,18(6):711-716.
- [4]段瑛瑜.菏泽地区牡丹病害调查和控制技术研究[D].南京:南京林业大学,2008:4-9.
- [5]康业斌,商鸿生,成玉梅.牡丹病害及其固有的化学抗病物质研究进展[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(增刊1):247-249.
- [6]杨德翠,郑国生.柱枝孢叶斑病侵染对牡丹生理特性的影响[J].北方园艺,2014(1):57-61.
- [7]吴玉柱,季延平,刘 毅,等.牡丹红斑病发病规律的观察[J].

中国森林病虫,2004,23(5):6-10.

- [8]刘家尧,刘 新.植物生理学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2010:195-204.
- [9]郝再彬,苍 晶,徐 仲.植物生理实验技术[M].哈尔滨:哈尔滨出版社,2002:202-212.
- [10]蒋选利,李振岐,康振生.过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(6):124-129.
- [11]王雅平,刘伊强,施 磊,等.小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性[J].植物生理学报,1993,19(4):353-358.
- [12]Lewis N G, Yamamoto E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1990, 41: 455-496.
- [13]王风敏,张鲁刚,刘 静,等.春夏大白菜黑斑病病原鉴定和抗性鉴定方法比较[J].植物保护学报,2007,34(6):614-618.
- [14]Thygesen P W, Dry I B, Robinson S P. Polyphenol oxidase in potato[J]. Plant Physiology, 1995, 109(2):525-531.