

杜 蕙,王春明,郭建国,等. 葡萄生单轴霉菌对葡萄几种防御酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):151-154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.035

葡萄生单轴霉菌对葡萄几种防御酶活性的影响

杜 蕙^{1,2}, 王春明^{1,2}, 郭建国^{1,2}, 漆永红^{1,2}, 蒋晶晶^{1,2}

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所,甘肃兰州 730070; 2. 农业农村部天水作物有害生物科学观测实验站,甘肃天水 741000)

摘要:以不同抗感霜霉病的葡萄品种高妻、夏黑、红地球及瑞比尔为材料,通过室内人工接种方法研究葡萄生单轴霉菌侵染后不同葡萄品种过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)及过氧化氢酶(CAT)活性的变化。结果表明,受葡萄生单轴霉菌侵染后不同抗性品种 POD、PPO、PAL 和 CAT 活性与对照相比均明显提高,抗病品种酶活性较感病和高感品种上升快且维持较高活性水平,抗性品种酶活性均出现 2 个高峰,第 1 个酶活性高峰较感病品种出现得早;抗病品种 CAT 和 PAL 活性较感病品种上升幅度更大,维持时间更长。

关键词:葡萄生单轴霉菌;过氧化物酶;多酚氧化酶;苯丙氨酸解氨酶;过氧化氢酶;葡萄霜霉病抗性机制

中图分类号:S436.631 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)15-0151-03

植物的抗病反应是寄主-病原物相互作用过程中所产生的一系列生理生化效应,保护反应是复杂的新陈代谢的结果,植物对病原物侵入的生理反应是通过酶的催化活动实现的。苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及过氧化氢酶(CAT)是植物体内重要的保护酶和防御酶。大量研究表明,这些酶在寄主与病原物互作中与植物的抗病性有着重要的关系^[1-3]。

葡萄霜霉病是由葡萄生单轴霉(*Plasmopara viticola*)引起的葡萄生产上最重要的病害之一,世界各地葡萄产区均有发生,是一种世界性病害^[4-5]。据调查,2010 年我国葡萄栽培面积达 55.2 万 hm²,严重发病地块的葡萄霜霉病发生率高达 70% 以上。1834 年在美国东北部的野葡萄上首次发现了葡萄霜霉病^[6-7]。我国 1899 年发现该病危害^[8],目前几乎所有的葡萄产区都有发生,潮湿多雨地区危害更为严重,发病时严重影响树势和果实品质^[9]。关于葡萄霜霉病的抗性研究主要集中在品种抗病性鉴定、病菌致病性分化及抗药性等方面^[10-14],而与抗性有关的防御酶活性研究较少。因此,本研究以生产中主栽的鲜食葡萄品种为材料,研究不同抗性葡萄品种感染葡萄生单轴霉菌后 POD、PPO、PAL 及 CAT 活性的变化,以期丰富葡萄霜霉病抗性机制研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄品种为高妻、夏黑、红地球、瑞比尔。

供试葡萄品种于 2013 年秋季扦插于甘肃省农业科学院植物保护研究所温室中。2014 年 8 月从田间采集新鲜的葡萄霜霉病叶片,用自来水反复冲洗掉老孢子囊后,在 20 ℃ 条

件下黑暗保湿培养 24~48 h,待新孢子囊长出后用毛笔刷下新鲜孢子囊,用无菌水配制成浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL 孢子囊悬浮液备用。

1.2 试验方法

1.2.1 品种抗性评价 采用室内离体叶片法结合田间自然发病调查进行品种抗性评价。室内离体叶片测定时分别采集供测试葡萄品种新梢大小和叶龄基本一致的健康叶片,将事先准备好的孢子囊悬浮液用喉头喷雾器在叶片背面均匀喷洒 10 mL,然后将叶片正面朝下放在铺有 4 层无菌水浸湿灭菌纱布的瓷盘中,为避免叶片与湿纱布接触腐烂,在叶片下放置玻璃棒,叶柄用脱脂棉保湿,磁盘用保鲜膜覆盖密封,于 20 ℃ 条件下黑暗保湿培养。以喷等量清水为对照,每个品种接种 10 张叶片,重复 3 次。逐日观察记录发病情况,最后用接种后 7 d 的调查数据计算病情指数。

田间自然发病调查参考刘天明等的方法^[15],2014 年在甘肃省农业科学院林果花卉研究所葡萄园分别在霜霉病初发期(7 月 5 日)、盛发期(8 月 16 日)及发病后期(9 月 22 日)共进行 3 次调查,每个品种选取 20 个新发的枝条,每个枝条自上而下调查 10 个叶位相同的叶片,记录发病情况,计算平均病情指数。室内及田间病害调查分级方法按照 0 级:无病斑;1 级:病斑面积占叶面积 5% 及以下;3 级:病斑面积占叶面积 6%~25%;5 级:病斑面积占叶面积 26%~50%;7 级:病斑面积占叶面积 51%~75%;9 级:病斑面积占叶面积 76% 及以上进行。品种抗性评价参考刘新秀等的 5 级分级法^[16]:免疫(I):病情指数为 0;高抗(HR):病情指数为 0.1~5.0;抗病(R):病情指数为 5.1~25.0;感病(S):病情指数为 25.1~50.0;高感(HS):病情指数为 50.1~100.0。

1.2.2 酶活性测定 将配制好的孢子囊悬浮液,采用喷雾法接种于温室盆栽葡萄苗叶片上,喷清水为对照,接种后保湿 24 h。并于接种后 24、48、72、96 h 分别采集长势一致、相同叶龄葡萄叶片进行酶活性测定,每个处理重复 3 次。所采集样品迅速放入液氮中速冻 0.5 h 后,置于 -40 ℃ 冰箱中保存备用。

POD、PPO、PAL、CAT 活性测定用苏州科铭生物技术有限

收稿日期:2018-05-03

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201203035);甘肃省科技支撑计划(编号:1204NKCA099);甘肃省农业科学院科技支撑计划(编号:2016GAAS08)。

作者简介:杜 蕙(1970—),女,甘肃定西人,硕士,研究员,主要从事经济作物病害及其防治技术研究。E-mail:dh0928@163.com。

公司生产的试剂盒进行,具体操作按试剂盒说明书进行。POD 活性以 1 g 组织在反应体系中 1 min 使 470 nm 处的吸光度变化 0.01,定义为 1 个酶活性单位;PPO 活性以 1 min 1 g 组织在反应体系中使 525 nm 处的吸光度变化 0.01,定义为 1 个酶活性单位;PAL 活性以 1 g 组织在反应体系中 1 h 使 290 nm 下吸光度变化 0.1,定义为 1 个酶活性单位;CAT 活性以 1 g 组织在反应体系中 1 min 使 240 nm 下吸光度变化 0.1,定义为 1 个酶活性单位。

1.3 数据分析

试验数据用 Excel 2003 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同葡萄品种对霜霉病的抗性评价

通过室内离体接种结合田间自然发病调查,根据病情指数进行葡萄抗病性评价结果如表 1 所示,高妻、夏黑对霜霉病表现为抗病(R),红地球对霜霉病表现为感病(S),瑞必尔表现为高感(HS)。各品种在室内接种条件下病情指数均高于田间自然发病的病情指数。因为室内离体接种所提供的环境

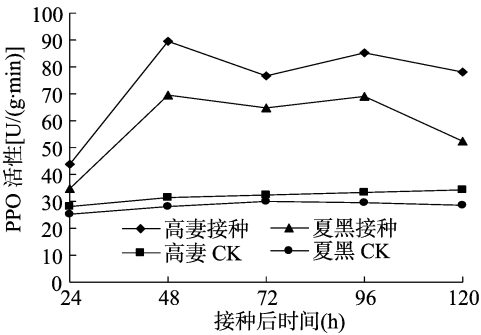


图1 不同葡萄品种 PPO 活性变化

2.2.2 不同葡萄品种 POD 活性测定结果 接种霜霉病菌后各品种 POD 活性变化见图 2。各品种酶活性与对照相比均有明显提高,且不同品种酶活性变化情况不同。抗性品种接种后酶活性升高速度快,且在 48、96 h 出现 2 个酶活性高峰,活

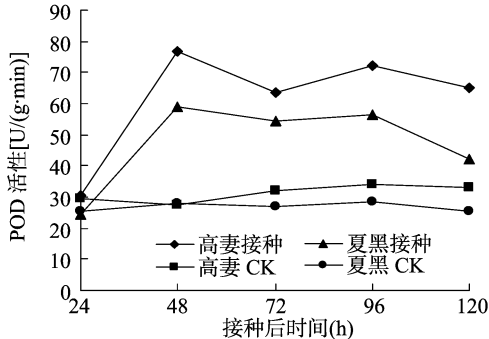


图2 不同葡萄品种 POD 活性变化

2.2.3 不同葡萄品种 CAT 活性测定结果 接种霜霉病菌后各品种 CAT 活性变化见图 3。各品种酶活性与对照相比均有明显提高,且不同品种酶活性变化不同。抗性品种接种后酶活性升高速度快,且在 48、96 h 时出现 2 个酶活性高峰,活性维持时间较长;感病和高感品种接种后酶活性缓慢增加,酶活性出现高峰的时间(72 h)较抗性品种晚,随后迅速下降。24~120 h 内抗性品种较感病和高感品种 CAT 活性长时间维

表 1 葡萄品种对霜霉病的抗性

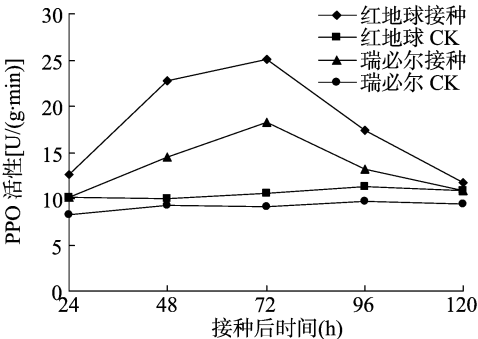
品种	室内离体测定		田间自然发病	
	病情指数	抗性	病情指数	抗性
高妻	18.61	R	6.12	R
夏黑	21.17	R	12.24	R
红地球	28.89	S	25.74	S
瑞必尔	64.26	HS	50.28	HS

注:表中数据为 3 次重复的平均值。

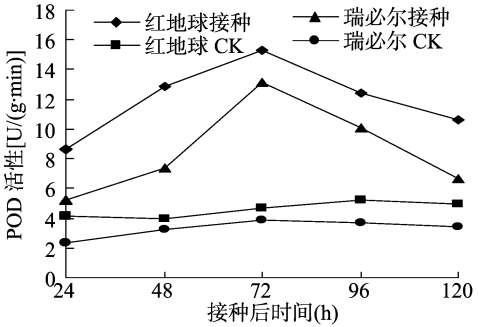
条件更有利于霜霉病的发生。

2.2 不同葡萄品种酶活性测定结果

2.2.1 不同品种 PPO 活性测定结果 接种霜霉病菌后各品种 PPO 活性变化见图 1。与对照相比,各品种活性均有明显提高,且不同品种之间存在差异。抗性品种接种后酶活性迅速升高,且在 48、96 h 出现 2 个酶活性高峰,活性维持时间较长;感病和高感品种接种后酶活性变化较为缓慢,且只在 72 h 出现了 1 个酶活性高峰,随后迅速下降。整个测试期间 PPO 活性表现为抗性品种>感病品种>高感品种。



性维持时间较长;感病和高感品种接种后酶活性缓慢增加,且只在 72 h 出现了 1 个小的酶活性高峰,随后迅速下降,高感品种下降速度更快。整个测试期间抗性品种 PPO 活性维持在较高的水平。



持在更高的水平。

2.2.4 不同葡萄品种 PAL 活性测定结果 不同品种接种霜霉病菌后 PAL 活性变化见图 4,各品种酶活性与对照相比均有明显提高,且不同抗性品种酶活性变化不同。抗性品种接种后酶活性升高速度快,且在 48、96 h 时出现 2 个酶活性高峰,活性维持时间较长;感病品种接种后酶活性缓慢增加,且只在 72 h 出现了 1 个酶活性高峰,随后迅速下降,高感品种

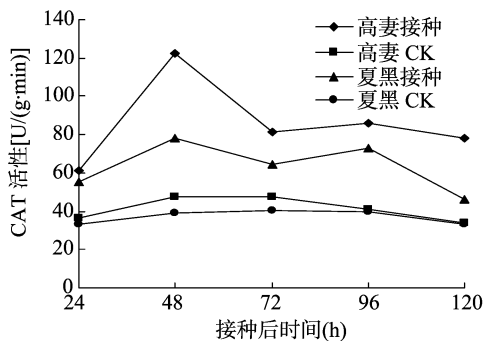


图3 不同葡萄品种 CAT 活性变化

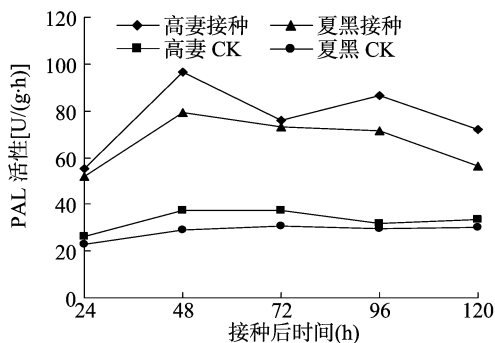
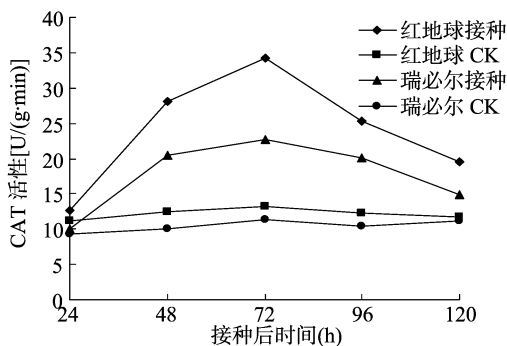
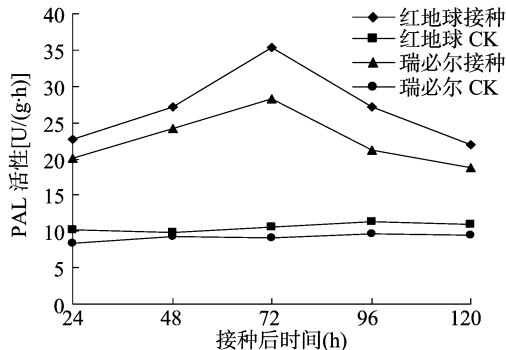


图4 不同葡萄品种 PAL 活性变化



下降速度更快。整个测试期间抗性品种 PAL 活性维持在较高的水平。

3 结论与讨论

通过不同抗性水平 4 个葡萄品种受葡萄生单轴霉菌侵染后 PPO、POD、CAT 及 PAL 这 4 种酶活性的变化可以看出,不同抗性品种受葡萄生单轴霉菌侵染后 POD、PPO、PAL 和 CAT 活性与对照相比均明显提高,抗病品种酶活性较感病和高感品种上升快且维持在较高活性水平,酶活性均出现 2 个高峰,第 1 个酶活性高峰较感病和高感品种出现得早;抗病品种 CAT 和 PAL 较感病品种活性上升幅度更大,维持时间更长,这与许多学者的研究结果^[17-20]一致。

植物与病原物长期协同进化过程中,植物形成了一系列复杂的防御机制抵御病原物的入侵。植物对病原物侵入的生理反应是以酶的催化活动实现的。植物体内的 POD、CAT、PPO、PAL 等防御酶都与抗病性有关^[21-22]。其中,POD、CAT 共同组成一个防御体系,能有效清除植物体内的自由基和过氧化物^[23]。PAL 是莽草酸途径的关键性酶,是酚代谢的主要酶之一,它的活性与酚类化合物的合成密切相关。酚的代谢产物被证实是潜在的抗病因子。酚被氧化产生活性很高的醌,而醌对病菌是有毒的。多酚的氧化与 PPO 和 POD 有关, PPO 和 POD 活性大幅度提高可以大大增加酚氧化物的含量。另外, PPO、POD 和 PAL 参与了木质素的合成,尤其是 PPO 和 POD。一方面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。另一方面木质素对病菌是有毒的,葡萄抗霜霉病品种中 PPO、POD 活性增加,促进了木质素的合成,增加了其防御功能。受病原菌侵染后酶活性迅速升高且抗性品种升高的幅度大于感病品种,从而表现对病害的抗性。因此,抗性组合中寄主受病原菌侵染后迅速产生足量量的酚类化合物

及木质素,从而产生过敏反应,杀死病菌,起到抗病的作用。感病组合不能产生足量量的酚类化合物,因此无过敏性反应产生,不能杀死病菌。

本试验酶活性测定结果表明,葡萄叶片受到葡萄生单轴霉菌侵染后, PPO、POD、PAL 及 CAT 活性增加在抗性品种中均明显高于感病和高感品种。尽管如此,也有一些观点认为酚类物质的积累和酚氧化物活性的增加与植物抗病反应无联系。不同的酶系在不同的寄主-病原物互作中的作用是有差异的,而且在不同的寄主与病原物组合中,同一种酶活性变化也不一致。因此,一种酶在抗病中的作用应根据具体情况具体分析,不能一概而论。

参考文献:

- [1] 马春红,郑秋玲,张凤莲,等. 玉米新改良群体多酚氧化酶活性变化[J]. 玉米科学,2011,19(2):70-72.
- [2] 李小娟,刘二明,谭小平,等. 3 种防御酶在水稻抗稻曲病中的活性变化[J]. 植物保护,2010,36(1):91-94.
- [3] 王光达,黄初女,吴委林,等. 不同玉米品种对大斑病的抗性及相关防御酶活性的关系研究[J]. 玉米科学,2014,22(5):146-152.
- [4] 赵奎华,陶承光,刘长远,等. 葡萄病虫害原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2006:6-7.
- [5] 郭小侠,唐周怀,陈川,等. 我国葡萄几种主要病害的研究现状[J]. 陕西农业科学,2002(11):18-21.
- [6] Gregory C T. Studies on *Plasmopara viticola* [J]. Phytopathology, 1914,4(6):399.
- [7] Thind T S, Arora J K, Mohan C, et al. Epidemiology of powdery mildew, downy mildew and anthracnose diseases of grapevine [J]. Diseases of Fruits and Vegetables, 2004(1):621-638.
- [8] 李海强. 石河子地区葡萄霜霉病的发生规律及防治研究[D]. 石河子:石河子大学,2009:1-2.

郑强卿,李鹏程,陈奇凌,等. 自然降温条件下不同产地酸枣抗性生理指标综合评价[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):154-158.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.036

自然降温条件下不同产地酸枣抗性生理指标综合评价

郑强卿,李鹏程,陈奇凌,王晶晶

(新疆农垦科学院,新疆石河子 832000)

摘要:比较不同产地酸枣的抗寒能力差异,为筛选优良的枣树砧木和选育新品种提供理论依据。在自然降温条件下,对不同产地 15 种酸枣 1 年生枝条生理生化指标进行测定,将测定值换算成抗寒系数,再将抗寒系数换算成隶属函数值,取各指标隶属度平均值对酸枣抗寒性强弱进行综合评定。在不同产地的 15 个酸枣类型中,属于抗寒类型的有 2 个,占 13.3%,中抗类型的有 6 个,占 40%,低抗类型的有 4 个,占 26.7%,其中无抗寒能力的只有 3 个,占 20%。酸枣渗透调节物质和抗氧化酶各指标的隶属值与可溶糖含量、脯氨酸含量呈显著相关,与超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)活性和丙二醛含量呈极显著相关。丙二醛含量和 SOD 活性无论在任何条件下均可作为植株抗寒性强弱评价或鉴定的指标。陕西清涧铁莲沟和袁家沟的酸枣具备较强的抗寒能力,其次是陕西米脂张岔村和河北省内丘县。

关键词:酸枣;抗寒;生理指标;综合评价

中图分类号: S665.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0154-05

枣(*Ziziphus jujube* Mill)是原产我国的特有果树和主要经济林树种,新疆是我国新兴的优质干枣生产基地。枣树在新疆丰富的果树资源中所占比例最高、面积最大,是经济优势最凸显的树种。但在新疆红枣产业快速发展过程中,尚未形成系统的栽培技术理论体系,如种植面积大、品种单一、抗逆性差等问题,是红枣产业可持续发展的制约因素。枣树抗逆能力强弱除与品种自身生物学特性相关之外,还与砧木酸枣

(*Ziziphus spinosus* Hu)的个体间差异和良种程度有关。尤其在冬季漫长且气候严寒的新疆,选育抗寒的优良砧木品系和枣树品种对新疆红枣产业的健康发展具有重要意义。果树在遭受低温胁迫时,最直接最直观的表现就是自身生理生化变化^[1]。研究结果表明,丙二醛(malondialdehyde,简称 MDA)含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量等指标虽不能直接判断植物的抗寒性强弱,但均与抗寒性有密切的关系^[2-4]。果树砧木抗寒性研究大多集中在苹果^[5-6]、葡萄^[7]、樱桃^[8]、山楂^[9]上,枣树砧木酸枣的抗寒性亦有部分报道^[10],是通过人工模拟低温对酸枣生长量以及部分生理指标进行对比研究。在新疆北部石河子市冬季漫长、气温较低的环境下,通过测试分析自然降温过程中酸枣当年生枝条生理生化指标,研究不同产地酸枣抗寒能力的强弱。通过研究不同产地酸枣当年生枝条的渗透调节物质含量、过氧

收稿日期:2018-05-03

基金项目:新疆生产建设兵团师域发展创新支持计划(编号:2017BA040)。

作者简介:郑强卿(1980—),男,甘肃会宁人,硕士,副研究员,研究方向为果树栽培与生理。E-mail:zhengqq369@163.com。

通信作者:陈奇凌,研究员,研究方向为林木栽培与生理生态。E-mail:Cql619@163.com。

[9]刘旭,杨晓畅,陶怡,等. 葡萄霜霉病拮抗细菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 果树学报,2015,32(4):681-688.

[10]张国军,徐海英,闫爱玲. 部分葡萄品种葡萄霜霉病田间调查[J]. 中国果树,2005(4):49-50.

[11]毕秋艳,马志强,韩秀英,等. 葡萄霜霉病菌对甲霜灵抗药性治理及其田间抗药菌株遗传稳定性分析[J]. 植物病理学报,2014,44(3):302-308.

[12]张艳艳,张剑侠,王跃进. 中国野生葡萄抗霜霉病基因 RAPD 标记的筛选[J]. 果树学报,2008,25(6):816-820.

[13]万怡震. 中国葡萄属野生种抗病性及抗病基因 RAPD 标记作图研究[D]. 西安:西北农林科技大学,2003:5-6.

[14]吕秀兰. 葡萄品种遗传多样性和霜霉病抗性鉴定的生化与分子生物学研究[D]. 成都:四川农业大学,2005:4-12.

[15]刘天明,李华,张振文. 鲜食葡萄品种对霜霉病的抗性抗病机理研究[J]. 植物保护学报,2001,28(2):118-122.

[16]刘新秀,金恭玺,李虎,等. 葡萄种质资源抗霜霉病鉴定[J]. 新疆农业科学,2013,50(5):857-863.

[17]任秀艳,辛惠普,马汇泉. 水稻感染污点病菌后三种酶活性的变化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2002,14(4):116-118.

[18]袁庆华,桂枝,张文淑. 苜蓿抗感褐斑病品种内超氧化物歧化酶、过氧化物酶和多酚氧化酶活性的比较[J]. 草业学报,2002,11(2):100-104.

[19]周博如,刘太国,杨微,等. 不同抗性的大豆品种感染细菌性疫病后 POD、PPO 变化的研究[J]. 大豆科学,2002,21(3):183-186.

[20]王戈,杨焕文,赵正雄,等. 烟草品种防御酶活性对黑胫病菌响应差异[J]. 云南农业大学学报,2012,27(3):321-326.

[21]王桥美,范静华,果志华,等. 烟草黑胫病菌毒素对烟草防御性相关酶的诱导作用[J]. 云南农业大学学报,2011,26(1):20-25.

[22]房保海,张广民,迟长风,等. 烟草低头黑病菌毒素对烟草丙二醛含量和某些防御酶的动态影响[J]. 植物病理学报,2004,34(1):27-31.

[23]徐鹏,李浩然,曹志艳,等. 玉米抵御鞘腐病菌侵染的生理机制[J]. 植物保护学报,2013,40(3):261-265.