

西瓜不同品种苗期感染枯萎病菌后的生理生化变化

王建明, 郭春绒, 张作刚, 贺运春, 李文英

(山西农业大学农学院植物病理系, 太谷 030801)

摘要: 研究了西瓜不同品种苗期感染枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *niveum*)后根部细胞的质膜透性、某些酶类和化合物,以及光合色素含量的动态变化。结果表明,受枯萎病菌侵染后,抗病品种克伦生在染病后的短时间内(48 h左右)能使细胞内MDA、相对电导率、SOD酶和CAT酶的代谢基本恢复到正常状态,其自我调节恢复正常状态的能力显著大于感病品种早花;抗病品种比感病品种具有保持较高脱氢酶活性的能力;抗病品种Vc含量明显高于感病品种;抗病品种可溶性糖的相对含量要比感病品种低;接菌1 d后抗病品种可溶性蛋白含量高于感病品种;抗病品种抑制叶绿素含量下降的能力和保持较高类胡萝卜素含量的能力明显强于感病品种。

关键词: 西瓜;品种;枯萎菌西瓜专化型;生理生化变化

Biochemical and Physiological Changes of Different Watermelon Cultivars Infected by *Fusarium oxysporum*

WANG Jian ming, GUO Chun rong, ZHANG Zuogang, HE Yun chun, LI Wen ying

(Department of Plant Pathology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: The dynamic changes in membrane permeability, activities of some enzymes, and contents of some chemical compounds and photosynthetic pigments in root cell of different watermelon cultivars were studied after they were infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* at seedling stage. The results showed that the capacities of self-regulating and returning to normal status of 'Kelunsheng', a resistant cultivar, were stronger than 'Zaohua', a susceptible one, in content of malonaldehyde (MDA), relative conductivity, and activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), when they were infected by *F. oxysporum* f. sp. *niveum*. The resistant cultivar maintained higher activity of dehydrogenase, relatively higher content of vitamin C (Vc), and relatively lower content of soluble sugar than the susceptible cultivar. The content of soluble protein was higher in resistant cultivar than in susceptible cultivar after 1 d. The capacities of resistant cultivar in inhibiting chlorophyll deterioration and maintaining higher carotenoid content were significantly stronger than those of susceptible cultivar.

Key words: Watermelon; Cultivars; *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; Biochemical and physiological changes

植物对病原物侵染的反应取决于植物与病原物互作的遗传基础。在与不亲和因子和与亲和因子相关的两种互作模式中,无论是非亲和(或无毒)因子还是亲和因子都是通过改变寄主的生理特性而起作用^[1]。所以不管是植物的抗病基因的表达,还是病原物的致病基因的表达,一般都是先从寄主和病原

物接触开始,通过表面分子互作,把信号传递到细胞内,启动一系列相关联的生理、生化反应来改变寄主的代谢特性而起作用^[1,2]。因此,植物受到病原物侵染后的生理、生化变化过程,实际上是寄主遗传基因开始表达,到出现病害表型的过程。所以,研究植物受到病原物侵染后的生理、生化变化,对进一步揭

收稿日期:2001-08-17

基金项目:山西省留学基金资助项目(96081)

作者简介:王建明(1958-),男,山西万荣人,教授,主要从事植物萎蔫性真菌病害致病机理及病生理方面的研究。Tel:0354-6288320;Fax:0354-6288324;E-mail:jm.w@sohu.com

示植物抗病性的遗传基础和深入了解抗病基因的表达方式及表达过程,有着十分重要的意义。有关病原物作为一种生物胁迫因子,侵染植物后引起一系列的病理生理变化,国内外有关学者对多种病害进行过大量研究^[1-3]。植物发生不同病害后都有其独特生理、生化变化,其抗病机制和致病机制也是多途径、多手段的综合作用。为此,本文试图从不同抗病性品种的西瓜幼苗受枯萎病菌感染后,分析细胞的质膜透性、某些化合物和酶活性以及光合色素含量的变化,探讨发生此类病害后寄主细胞的生理、生化反应,为阐述寄主与病原物的互作关系和揭示此类病害的致病机理提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的西瓜[*Citrullus lanatus*(Thunb.) Mansfeld]品种有感病品种早花和郑杂5号,抗病品种克伦生^[4]。供试菌种分离自太谷地区种植的P₂西瓜品种上。

1.2 方法

1.2.1 接种方法 将供试种子用75%酒精进行表面消毒,然后用无菌水冲洗数遍,再浸种12h后放在经过灭菌的培养皿中保湿,待种子发芽、胚根约1cm左右时,将一部分发芽的种子在浓度为每毫升 4.50×10^6 个孢子的悬浮液中浸蘸一下,作为接菌处理(以下简称处理TR);将另一部分种子在无菌水中浸蘸一下作为对照(以下简称对照CK)。然后将处理和对照种子播种到经过灭菌的沙土瓷盘中,定时浇Hogland营养液,定期取根部,进行有关指标的测定。其中MDA含量、SOD和CAT酶活性测定,前5d每24h取样测试1次,接菌后1~10d内共测7次;电导率、脱氢酶及光合色素接菌后1~8d内1.4和8d各测1次;Vc、可溶性糖和蛋白质接菌后1~5d内1.3和5d各测1次。

1.2.2 丙二醛(MDA)测定方法 用TBA比色法测定^[5]。

1.2.3 相对电导率测定方法 用DDS-II型电导仪按西北农业大学方法测定^[6]。

1.2.4 SOD酶活性的测定方法 采用NBT光还原法^[5]。以抑制光还原50%为一个酶活单位。

1.2.5 CAT酶活性的测定方法 按Thomas Brennan和Chain Frenkel方法测定^[7]。即取2ml $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, 0.5ml $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液,加入酶液1ml开始计时,21℃条件下反应6min,立即

加入2% TiCl_4 1ml,络合剩余的 H_2O_2 ,以终止反应并显色,加3ml $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 于420nm处比色。

1.2.6 脱氢酶活性的测定方法 按黄学林等的方法测定^[8]。

1.2.7 Vc、可溶性糖和可溶性蛋白的测定方法 抗坏血酸Vc按1,6-二氯靛酚钠盐氧化法^[5],取根茎部进行测定;可溶性糖按蒽酮比色法^[5],可溶性蛋白按Folin酚试剂法^[5],取全株进行测定。在接种后第1、3、5天取处理和对照进行测定。

1.2.8 叶绿素、类胡萝卜素测定方法 按朱广廉的方法测定^[9]。

以上各项指标测定时,每次每项指标均重复测3次,以其平均值进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 枯萎病菌对细胞膜透性的影响

2.1.1 抗病和感病品种植株体内丙二醛含量的动态变化 试验结果如图1所示。可以看出,无论抗病品种克伦生还是感病品种早花,接菌1d后其体内的MDA含量总体上均呈下降趋势,并且抗病品种的MDA含量总体水平低于感病品种,但不同时期存在着明显差异。同时,抗病品种在接种后1d,处理的体内MDA含量最高,但紧接着迅速下降,到第3天基本和对照相近,而且显著低于早花的处理和对照,随后处理的动态变化曲线和对照的变化曲线态势基本吻合,趋于一致,而感病品种早花处理和对照的变化曲线始终分离,难以吻合。这说明,抗病品种克伦生感染枯萎病菌后其自我调节恢复到正常状态的能力以及抗膜脂过氧化的能力均比感病品种早花强。

2.1.2 抗病和感病品种细胞相对电导率的动态变化 膜透性用电解质渗漏的相对电导率表示。结果(图2)表明,抗病品种克伦生和感病品种早花,染病后其细胞的相对电导率均呈上升趋势,而且抗病品种电解质渗漏低于感病品种,但不同时期存在着明显差异,如接种后1~2d,抗病品种的渗漏高于感病品种,而约2d后,抗病品种的渗漏则一直低于感病品种。从图中还可以看出,接种1d后,抗病品种处理和对照的相对电导率差异越来越小,二者的变化曲线趋于吻合,而感病品种处理和对照的相对电导率差异越来越大,二者的变化曲线明显分离,难以吻合。说明抗病品种自我调节恢复到正常状态的能力以及抗电解质渗漏的能力均比感病品种早花强。

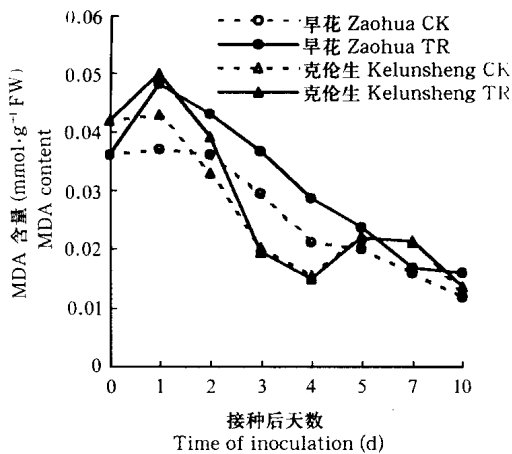


图 1 不同抗病和感病品种丙二醛含量的动态变化

Fig.1 Dynamic changes of MDA content in different watermelon cultivars

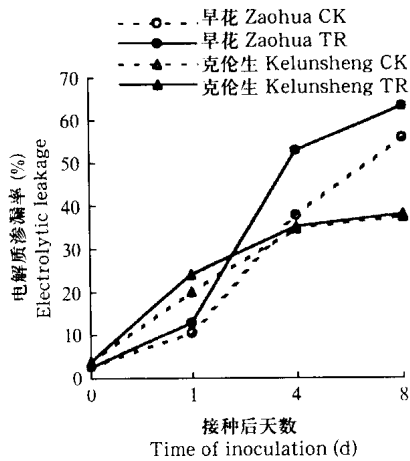


图 2 根部电解质渗漏率变化

Fig.2 Changes of electrolytic leakage in roots

2.2 枯萎病菌对某些酶活性的影响

2.2.1 抗病和感病品种体内 SOD 酶活性的动态变化 试验结果(图 3)表明,虽然抗病和感病品种体内 SOD 酶活性变化比较复杂,抗病品种克伦生和感病品种早花,SOD 酶活性总体上处理的低于对照的,而且感病品种的下跌幅度大于抗病品种。从图中还可明显看出,虽然抗病和感病品种的 SOD 酶活性的动态曲线都呈波浪式变化,但抗病品种克伦生的对照和处理在接菌 2d 后其曲线就相互接近,以后其动态变化曲线态势趋于一致,且基本吻合,而感病品种早花的对照和处理的动态变化曲线态势始终差异较大难以吻合,这说明在受到病原菌的侵染后,感病品种早花细胞内酶防御系统发生严重的紊乱,而抗病品种克伦生自我调节恢复正常状态的能力明显比感病品种早花强。

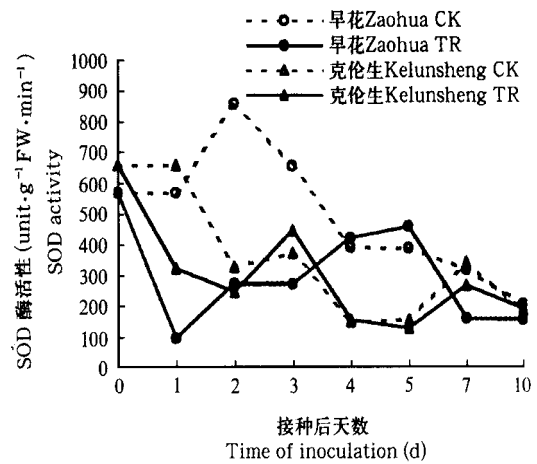


图 3 不同抗病和感病品种 SOD 酶活性动态变化

Fig.3 Dynamic changes of SOD activity in different watermelon cultivars

2.2.2 抗病和感病品种体内 CAT 酶活性的动态变化 试验结果(图 4)表明,抗病和感病品种体内 CAT 酶活性变化比较复杂。处理和对照在接菌后第 1 天,抗病品种克伦生体内 CAT 酶活性均高于感病品种早花,而且在接种后的 1~10 d,抗病品种克伦生处理与对照间的增减比率(或幅度),即 (TR-CK)/CK 值则明显低于感病品种早花,同时处理和对照的动态变化态势基本接近并趋于吻合;而早花 CAT 酶活性除第 1 天处理低于对照外,其余处理均高于对照,并且处理和对照的动态变化曲线难以吻合,变幅较大。说明在受到病原菌的侵染后,抗病品种自我调节恢复正常状态的能力明显强于感病品种。

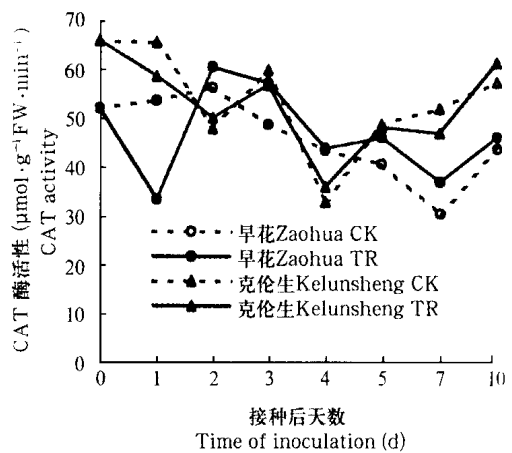


图 4 不同抗病和感病品种 CAT 酶活性动态变化

Fig.4 Dynamic changes of CAT activity in different watermelon cultivars

2.2.3 抗病和感病品种体内脱氢酶活性的动态变

化 试验结果(图 5)表明,抗病品种克伦生处理和对照的脱氢酶活性均呈上升趋势,虽然其处理的酶活性低于对照,但二者的变化态势相同,其差值并没有随时间延长而加大,在第 8 天还略有缩小。而感病品种早花对照的脱氢酶活性呈上升趋势,处理却呈下降趋势,并且随时间延长,二者的差异越来越大。说明抗病品种比感病品种具有保持较高脱氢酶活性的能力。

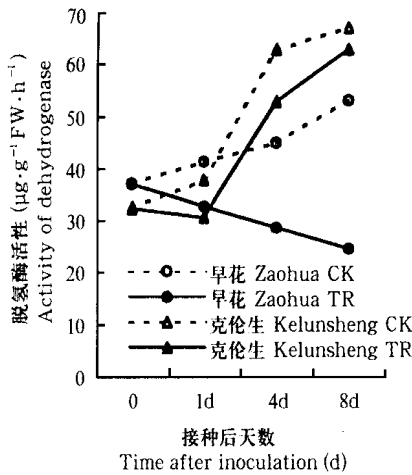


图 5 根部脱氢酶活性变化

Fig.5 Changes of dehydrogenase activity in roots

2.3 枯萎病菌对某些物质含量的影响

2.3.1 枯萎病菌对不同品种 Vc 含量的影响 试验结果(表 1)表明,抗病品种的 Vc 相对含量均明显高于感病品种。如抗病品种克伦生处理的 Vc 含量在接种后 1~5 d 均高于对照,而感病郑杂 5 号品种的处理则均低于对照。

2.3.2 枯萎病菌对不同品种可溶性糖含量的影响

试验结果(表 1)表明,抗病品种克伦生的可溶性糖含量处理均比对照低,且第 1 天降幅最大,其处理比对照降低了 49.8%。而感病品种早花处理的可溶性糖含量在接种后第 1 天和第 5 天比对照略低,第 3 天则略高于对照,处理比对照增加了 2.5%。同时从表 1 还可看出,接种处理后两品种可溶性糖含量虽然普遍都有所降低,但相比较而言,抗病品种可溶性糖的相对含量要比感病品种低。

2.3.3 枯萎病菌对不同品种可溶性蛋白含量的影响

试验结果(表 1)表明,抗病品种可溶性蛋白含量在接种后第 1 天处理比对照明显减少,第 3 天和第 5 天则比对照明显增高,且第 3 天增幅较大;而感病品种的处理在接种后第 1 天比对照明显增高,第 3 天和第 5 天明显减少,且第 3 天降幅较大。同时还可看出,抗病和感病品种的可溶性蛋白含量存在明显差异,其动态变化趋势正好相反。

表 1 不同抗病和感病品种体内 Vc、可溶性糖和可溶性蛋白含量变化 (mg·g⁻¹ FW)

Table 1 Contents of Vc, dissoluble sugar and dissoluble protein in different watermelon cultivars

测定项目 Item	接种后时间 Day of inoculation (d)	郑杂 5 号 Zhengza5			克伦生 Kelunsheng		
		Treat ment (TR)	Control (CK)	(TR-CK) /CK	Treat ment (TR)	Control (CK)	(TR-CK) /CK
Vc	1	0.079	0.116	-0.318	0.096	0.095	+0.016
	3	0.245	0.308	-0.205	0.420	0.245	+0.714
	5	0.389	0.557	-0.302	0.504	0.399	+0.263
可溶性糖 Soluble sugar	1	4.938	5.280	-0.065	0.892	1.776	-0.498
	3	2.005	1.957	+0.025	2.043	2.148	-0.049
	5	4.604	6.264	-0.265	4.502	7.006	-0.357
可溶性蛋白 Soluble protein	1	10.590	5.550	+0.908	7.110	14.400	-0.506
	3	5.560	12.220	-0.545	12.220	6.780	+0.802
	5	4.220	6.920	-0.390	6.220	5.100	+0.220

2.4 枯萎病菌对光合色素的影响

2.4.1 枯萎病菌对叶绿素含量的影响 试验结果(表 2)表明,抗病品种克伦生和感病品种早花,接菌处理后叶绿素(a+b)含量与对照相比都有所减少,但抗病品种的减少幅度明显低于感病品种。说明受枯萎病菌侵染后,抗病品种克伦生具有较高抑制叶绿素含量下降的能力。

2.4.2 枯萎病菌对类胡萝卜素含量的影响

试验结果(表 3)表明,抗病品种克伦生的类胡萝卜素含量,除第 1 天处理比对照略有减少外,其余时间均高于对照,第 8 天处理比对照增加 14.74%;而感病品种早花的类胡萝卜素含量,处理一直低于对照,第 8 天处理则比对照减少了 28.27%。说明受枯萎病菌侵染后,抗病品种克伦生具有保持较高类胡萝卜素含量的能力。

表 2 不同抗病和感病品种体内叶绿素(a+b)含量变化($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)Table 2 Contents of chlorophyll a and b in different watermelon cultivars ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)

处理时间 Day of inoculation (d)	早花 Zaohua			克伦生 Kelunsheng		
	Treat ment (TR)	Control (CK)	(TR-CK) /CK	Treat ment (TR)	Control (CK)	(TR-CK) /CK
1	604.03	404.38	-0.3305	542.11	448.72	-0.1723
4	736.46	592.66	-0.1953	1036.92	965.23	-0.0691
8	742.74	646.87	-0.1291	1107.48	1040.26	-0.0607
平均 Average	694.41	547.97	-0.2183	895.50	818.07	-0.1007

表 3 不同抗病和感病品种体内类胡萝卜素含量变化($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)

Table 3 Contents of carotenoid in different watermelon cultivars

处理时间 Day of inoculation (d)	早花 Zaohua			克伦生 Kelunsheng		
	Treat ment (TR)	Control (CK)	(TR-CK) /CK	Treat ment (TR)	Control (CK)	(TR-CK) /CK
1	345.26	294.87	-0.1459	306.26	282.96	-0.0761
4	373.38	351.74	-0.0580	504.38	557.29	+0.1049
8	449.88	322.68	-0.2827	547.95	628.73	+0.1474
平均 Average	389.51	323.10	-0.1622	452.86	489.66	+0.0587

3 结论与讨论

3.1 根据 Haber-Weiss 分子氧到水的单电子还原路径, SOD 酶主要清除超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)成 H_2O_2 , CAT 酶主要还原 H_2O_2 为 H_2O 。从图 1、图 3、图 4 中可以看出,在抗病品种中,接菌 1 d 内细胞内 MDA 逐步升高,1 d 时含量最高,随后逐渐降低,而 SOD 和 CAT 酶在 2 d 时才逐步升高,第 3 天时活性最高,这种变化可能是由于抗病品种在病菌侵染早期有一个氧化跃变过程,而活性氧的急促释放起到传递信号的作用,使植物及时识别病菌并启动防卫机制(如某些保护酶的激活或活性增高等)。但有关氧化跃变、保护酶及抗病性之间的相互关系和保护酶间的协同关系等有待进一步探讨。

3.2 试验结果表明,西瓜幼苗受枯萎病菌侵染后,一个共同的特点是抗病品种克伦生在染病后的短时间内(大约 48 h 左右)能使细胞内 MDA、相对电导率、SOD 酶和 CAT 酶的代谢基本恢复到原来的正常状态,而感病品种早花则发生严重紊乱,难以恢复到原来的正常状态。抗病品种自我调节恢复正常状态的能力显著大于感病品种早花。综合国内外此方面的研究结果,目前人们判断品种是否抗病,大都以某些物质含量的多少或酶活性的高低来作为衡量的标准^[2,3,5]。但大量的研究表明,生理、生化指标量的大小或活性的高低在抗病和感病品种上的表现不尽相同,前人研究的结果也无一个共同的规律可循。因此,笔者认为判断品种是否抗病,除了其细

胞的一些生理、生化指标量的大小可以作为一个重要的参考依据外,更为重要的是应看寄主在受到病原菌侵染后,所观察的生理、生化指标能否通过一定的生化抗性机制而恢复到原来的正常状态,其能力的大小可能是更为科学的判断依据。但有关不同保护酶及一些生化抗性物质的抗性机制还有待做进一步的深入研究。

3.3 脱氢酶活性大小是根系活力的重要指标,其活性越高,表明根系的代谢越旺盛,产生的能量物质越充足^[5,8]。高等植物中叶绿素(包括叶绿素 a、b)是捕光色素,捕光色素越丰富,捕捉的光能越多,利用光能还原二氧化碳产生的碳水化合物就越多,这样就越有利于细胞组织的建成。此外,类胡萝卜素既是植物光合色素,又是植物内源抗氧化剂,它在吸收光能、保护叶绿素及猝灭活性氧方面起重要作用。在本试验中,在受枯萎病菌侵染后,抗病品种克伦生与感病品种早花相比,具有相对较高的脱氢酶活性和叶绿素含量以及较高的类胡萝卜素含量。这对维持其细胞膜的完整性、正常的代谢和生长发育,进而抵抗病害的侵染都是十分有利的。

3.4 Vc 作为一种还原性物质,参与植物体内的氧化还原过程,可减少和清除植物体内某些有害的自由基,对植物具有保护作用。本试验结果表明,抗病品种接种处理后 Vc 含量增大,而感病品种降低,这说明病菌侵染后抗病品种的自我保护作用相对增强,而感病品种的自我保护作用相对减弱。

3.5 可溶性糖在植物体内主要参与呼吸代谢,呼吸

作用可为植物生理活动提供能量和为其它物质的合成提供中间产物。从试验结果看,接菌处理 1 d 后,抗病品种可溶性糖相对含量明显低于感病品种,这可能是由于抗病品种为抵抗病原物侵害,呼吸作用比感病品种显著增强,或为合成保护性物质而需要较多的物质来源所致。

3.6 关于蛋白质与植物抗性的关系, Uritani 等研究证实,感病植物接种病原物后,在侵染初期,感病植物与病原物蛋白质总含量增加^[10]。从本试验结果看,感病品种在接种后第 1 天可溶性蛋白含量显著增加,这与上述结论基本吻合。对于蛋白含量在抗病品种中的作用和机制还需做进一步的探讨。

References

- [1] Zhang D S, Chen S Y. Molecular biology of plant disease resistance. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1997, 27(2) : 97 - 103. (in Chinese)
张德水, 陈受宜. 植物抗病性的分子生物学研究进展. *植物病理学报*, 1997, 27(2) : 97 - 103.
- [2] Wang J S. *Molecular Plant Pathology*. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 1 - 49. (in Chinese)
王金生. 分子植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 1999: 1 - 49.
- [3] Zhang Y S. *Physiological Plant Pathology*. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1996. (in Chinese)
章元寿. 植物病理生理学. 南京: 江苏科技出版社, 1996.
- [4] He Y C, Li P J, Wang J M, Zheng J W, Gao J M. Preliminary identification of the resistance of watermelon cultivars in field to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 1991, (Suppl.) : 67 - 68. (in Chinese)
贺运春, 李培均, 王建明, 郑经武, 高俊明. 西瓜品种田间抗枯萎病的初步研究. *山西农业大学学报*, 1991, (专刊) : 67 - 68.
- [5] Wang J S, Guo C R, Liu G L. *Agrobiotechnology*. Taiyuan: Shanxi Science and Technology Press, 1997: 164 - 170, 22 - 24, 144 - 146, 154 - 155. (in Chinese)
王金胜, 郭春绒, 刘桂林. 农业生物化学技术. 太原: 山西科学技术出版社, 1997: 164 - 170, 22 - 24, 144 - 146, 154 - 155.
- [6] Northwest Agricultural University. *Experiment Instruction of Plant Physiology*. Xian: Shaanxi Science and Technology Press, 1997: 104 - 106. (in Chinese)
西北农业大学. 植物生理学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1997: 104 - 106.
- [7] Thomas B, Chain Frenkel. Involve ment of Hydrogen Peroxide in the Ragulation of senscence in pear. *Plant Physiol*. 1997, 59: 411 - 416.
- [8] Huang X L. *Guide to Seed Physiology*. Beijing: Agricultural Press, 1990: 89 - 92. (in Chinese)
黄学林. 种子生理学实验手册. 北京: 农业出版社, 1990: 89 - 92.
- [9] Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. *A Laboratory Manual of Plant Physiology*. Beijing: Peking University Press, 1990: 51 - 54. (in Chinese)
朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990: 51 - 54.
- [10] Zhao K F, Wang S T. *Physiological Resisitance in Crops*. Beijing: Agricultural Press, 1990: 31 - 33. (in Chinese)
赵可夫, 王韶唐. 作物抗性生理. 北京: 农业出版社, 1990: 31 - 33.