

甘蓝链格孢菌侵染对白菜保护酶活性和 H₂O₂ 含量的影响

王利英, 侯喜林*, 刘琳, 陈晓峰

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要: 以抗黑斑病白菜‘苏州青’自交系和感黑斑病白菜‘短白梗’自交系为材料, 研究其接种甘蓝链格孢菌后保护酶活性及 H₂O₂ 含量的变化。结果显示, 抗病和感病材料的多酚氧化酶 (PPO)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性与接种前相比均升高, 且抗病材料的 PPO、SOD 活性始终高于感病材料, 而 CAT 活性低于感病材料; 接种后抗病材料苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性升高, 而感病材料的 PAL 活性降低; 抗病和感病材料接种后过氧化物酶 (POD) 活性、H₂O₂ 含量均呈上升趋势, 且抗病材料的 H₂O₂ 含量能很快降至较低水平。由此表明: 甘蓝链格孢菌侵染白菜后, 抗病材料与感病材料相比, 能生成较多的 PAL 和 PPO 抵抗病原菌的侵染, 并能短时迸发 H₂O₂ 刺激抗氧化酶活性升高, 使植物体内 H₂O₂ 含量处于相对较低的水平, 降低活性氧伤害。

关键词: 白菜; 甘蓝链格孢菌; 保护酶; H₂O₂

中图分类号: S 634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 07-1065-04

Effects of *Alternaria brassicicola* (Berkeley) Saccardo Infection on Activities of Protective Enzymes and H₂O₂ content in Non-heading Chinese Cabbage

WANG Li-ying, HOU Xi-lin*, LIU Lin, and CHEN Xiao-feng

(State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Changes of protective enzymes activities and the content of H₂O₂ were studied after *Alternaria brassicicola* infection on two non-heading Chinese cabbage materials (Suzhouqing and Duanbaigeng). Results showed that PPO activity, SOD activity and CAT activity were increased in both disease-resistant material and disease-susceptible material, and PPO activity, SOD activity in Suzhouqing were higher than that in Duanbaigeng after infection, while CAT activity was lower than that in Duanbaigeng. As to PAL activity, it was increased in Suzhouqing but decreased in Duanbaigeng. POD activity and H₂O₂ content were increased in both Suzhouqing and Duanbaigeng after inoculation, and the content of H₂O₂ could be lowered quickly in disease-resistant line. Thus it could be considered that compared with disease-susceptible material, disease-resistant material was able to produce more PPO and PAL that may resist the infection of *Alternaria brassicicola*, and was able to produce more H₂O₂ in a short time to promote antioxidant enzymes activities, which could maintain low H₂O level and reduce the damage of reactive oxygen species after inoculation.

Key words: non-heading Chinese cabbage; *Alternaria brassicicola*; protective enzymes; H₂O₂

白菜黑斑病是由甘蓝链格孢菌 (*Alternaria brassicicola*) 引起的在我国南方白菜生产区危害严重的一种病害。病原菌对植物的伤害大多与植物体内的活性氧代谢失调有关 (李兰真等, 1999)。多酚氧化酶 (PPO)、丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶

收稿日期: 2008-03-04; 修回日期: 2008-05-19

基金项目: ‘十一五’ 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A7-1-11)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

(CAT) 与抗病反应的关系已有较多报道 (宋瑞芳 等, 2007)。本研究中以白菜抗黑斑病 ‘苏州青’ 自交系和感黑斑病的 ‘短白梗’ 自交系为材料, 对抗病相关的保护酶 PPO、PAL、SOD、CAT、POD 及 H_2O_2 进行研究, 以探讨白菜与甘蓝链格孢菌之间的互作关系, 为进一步揭示白菜黑斑病抗性机理提供理论依据。

1 材料与方法

田间采集感黑斑病的白菜叶片, 参照方中达 (1979) 的方法进行病原菌分离和纯化, 所得纯菌株进行苛赫 (Koch) — 史密斯 (Sruith) 原理验证, 并在显微镜下进行形态学鉴定为甘蓝链格孢菌。

白菜抗黑斑病材料 ‘苏州青’ 自交系和感黑斑病材料 ‘短白梗’ 自交系由南京农业大学白菜课题组提供。种子经 0.1% $HgCl_2$ 灭菌后于 2007 年 9 月 2 日播种于装有灭菌基质的穴盘中, 在人工气候箱 25 °C, 12 h/12 h 光周期下培养, 待长至两叶一心期进行人工接种。血球计数法配制浓度为 1.0×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$ 的孢子悬浮液, 均匀喷洒在叶片上, 以叶片湿而不滴为宜。接种后在 25 °C 黑暗保湿 24 h 后正常管理。于接种后 0、6、12、24、36、48、72、96 和 108 h 分别取相同叶位叶片, 保存于 -70 °C 冰柜中待测。每处理设 3 次重复。

PPO 测定参照汤章城 (1999) 的方法; PAL 测定参照薛应龙 (1985) 和吕秀兰等 (2004) 的方法; SOD 测定采用 NBT 法 (薛应龙, 1985); POD 测定采用愈创木酚法 (叶凡 等, 2007); CAT 活性的测定采用分光光度计法 (叶凡 等, 2007), 以每克每分钟变化 0.01 为 1 个酶活性单位 (U)。 H_2O_2 的测定参照 Ferguson 等 (1983) 的方法, 略有改动, 取 0.1 g 叶片用预冷丙酮 1.6 mL 研磨成匀浆, 3 000 g 离心 10 min。取 1 mL 提取液, 加 20% $TiCl_4$ 浓 HCl 溶液 0.1 mL, 浓氨水 0.2 mL, 3 000 g 离心 10 min, 沉淀用丙酮悬浮洗涤 5 次后溶于 3 mL $1 mol \cdot L^{-1} H_2SO_4$, 测定 A_{410} 值, 然后换算成通用单位 $\mu mol \cdot g^{-1} FM$, 表示 H_2O_2 含量。数据统计分析采用 DPS 数据处理系统。

2 结果与分析

2.1 白菜接种甘蓝链格孢菌后 PPO 和 PAL 活性的变化

如图 1, A 所示, 苏州青和短白梗接种后 PPO 活性均升高, 且苏州青始终高于短白梗。苏州青和短白梗中 PPO 活性均在接种后 12 h 和 72 h 出现两个峰值, 苏州青分别为接种前的 1.49 倍和 1.66 倍, 短白梗分别为接种前的 1.20 倍和 1.25 倍。

从图 1, B 可知, 接种前苏州青中 PAL 活性远高于短白梗。接种后 36 h, 短白梗中 PAL 活性逐渐降低, 在 72 h 达到最小值, 为接种前的 67.69%, 而苏州青中 PAL 活性逐渐升高, 在 72 h 达到最大值, 为接种前的 1.24 倍, 是短白梗的 2.51 倍。

2.2 白菜接种甘蓝链格孢菌后 CAT、SOD、POD 活性的变化

如图 1, C 所示, 接种后苏州青和短白梗中 CAT 活性均明显升高, 且除 12 h 外, 短白梗提高的幅度大于苏州青。苏州青中 CAT 活性峰值出现在接种后 12 h 和 72 h, 短白梗的 CAT 活性峰值出现在接种后 6 h 和 72 h。短白梗 CAT 活性第一个峰值出现的比抗病品种的早, 正说明了苏州青 H_2O_2 在接种后 6 h 能迅速积累而短白梗没有明显变化这一结果。

如图 1, D 所示, 苏州青接种后 SOD 活性出现小幅度升高, 短白梗呈现下降趋势, 24 h 后两者的 SOD 活性均开始升高, 并在 72 h 达到峰值。苏州青在 6 h 出现的小幅度升高, 很可能是植物防御体系应激反应的表现, 而苏州青和短白梗在 72 h 时出现的较高峰值则可能是 SOD 相关基因表达的结果。

如图 1, E 所示, 接种前短白梗中 POD 活性明显高于苏州青; 接种后, 苏州青中 POD 活性急剧升高, 6 h 达到最大值, 为接种前的 1.88 倍; 而短白梗接种后 POD 活性下降, 12 h 后苏州青和短白梗的 POD 活性均开始升高, 两者与接种前相比较, 其增长幅度没有明显差别。

2.3 白菜接种甘蓝链格孢菌后 H_2O_2 含量的变化

如图 1, F 所示, 接种后苏州青中 H_2O_2 的含量迅速升高, 在 6 h 达到最大值, 为接种前的 1.33 倍, 12 h 后 H_2O_2 处于相对较低的水平; 短白梗接种 6 h 后 H_2O_2 含量开始升高, 在 36 h 达到最大值, 为接种前的 1.72 倍。

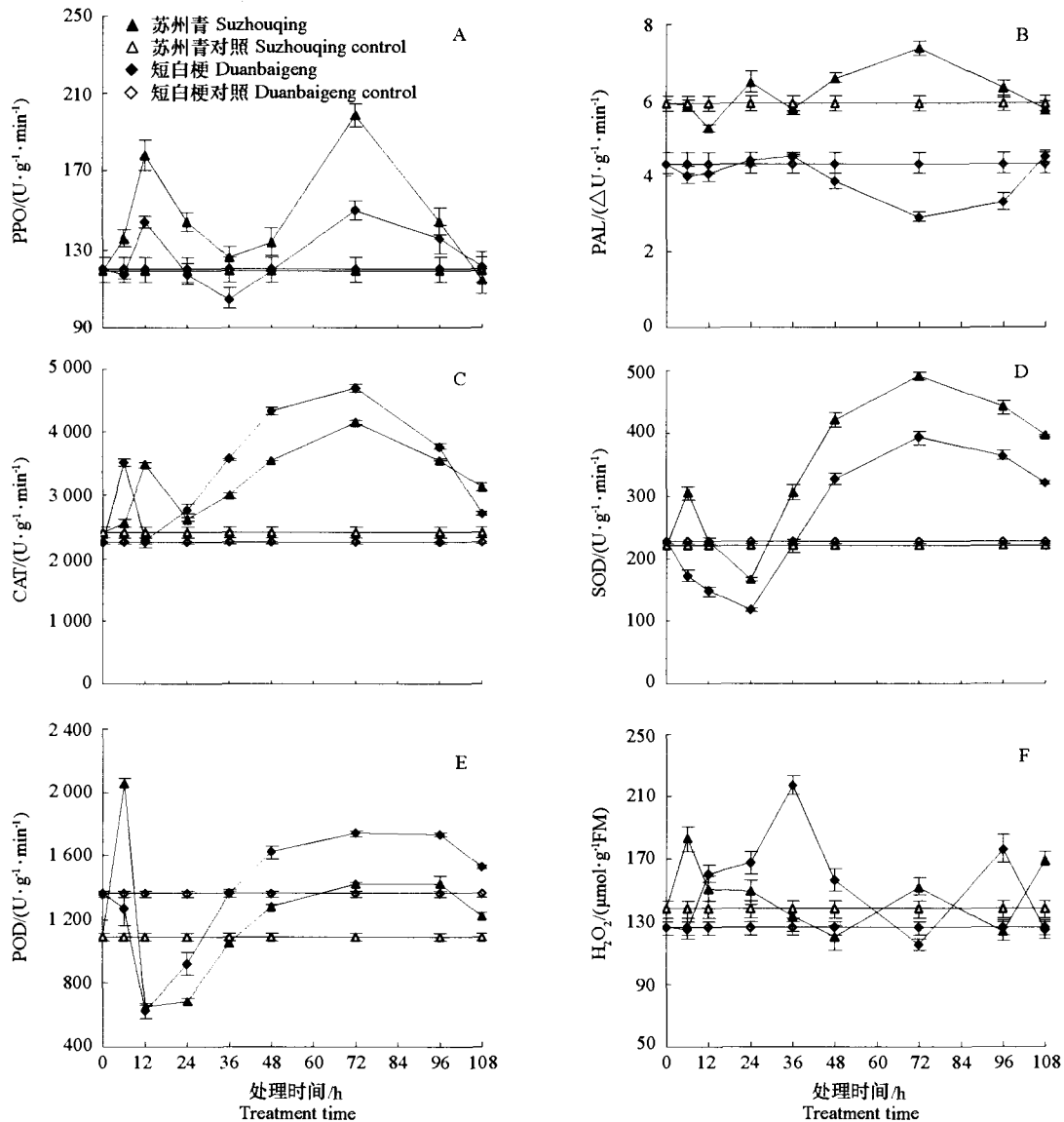


图 1 接种甘蓝链格孢菌后 PPO、PAL、CAT、SOD 和 POD 活性及 H_2O_2 含量的变化

Fig. 1 Changes of PPO, PAL, CAT, SOD, POD activities and H_2O_2 content infected with *Alternaria brassicicola*

3 讨论

PPO、PAL 是次生代谢物质合成过程中的关键酶, 能促使植物体产生次生代谢物质抵抗病原菌的侵染, 从而起到抗病的作用, 被认为是植物的防御酶之一。很多研究者认为 PPO 活性与植物的抗病性成正相关 (李靖 等, 1991; 徐建华 等, 1995)。刘学敏等 (2003) 对烟草接种赤星病菌后的研究表明, 抗病品种的 PAL 活性升高, 而感病品种的 PAL 活性降低。本研究结果与前人的一致, PPO、

PAL 对白菜黑斑病抗性起着重要的作用,其原因可能是病原菌的侵染可以快速促进酚类化合物和木质素的合成和积累,以抵御病原菌的侵染和扩展,从而提高寄主抗病能力。

逆境因子对植物的伤害大多与植物体内的活性氧代谢失调有关。试验结果表明,甘蓝链格孢菌侵染白菜后,短时间胁迫即可使白菜体内积累 H_2O_2 (图 1, F)。 H_2O_2 过多会导致细胞伤害,同时也可作为第二信使来激活防卫基因的表达,提高植物的抗性。本研究中,苏州青接种 6 h 便产生 H_2O_2 的激增,刺激了抗氧化酶活性的升高,病原菌侵染后 24 h 苏州青的 CAT、POD 活性均升高,使苏州青的 H_2O_2 处于较低的水平。短白梗接种后也发生 H_2O_2 的积累,诱导 CAT、POD 活性升高,但短白梗中 CAT 活性升高幅度高于苏州青,可能是由于短白梗体内 H_2O_2 含量远高于苏州青,从而诱导较多 CAT 相关基因表达的结果,以减轻 H_2O_2 对植物体的伤害,也说明 CAT 在清除植物体过多 H_2O_2 中的重要作用。SOD 也是清除活性氧保护酶之一,能催化 O^{2-} 歧化反应生成 O_2 和 H_2O_2 ,其活性被认为是抵抗逆境的重要指标。白菜接种甘蓝链格孢后,苏州青和短白梗中 SOD 活性均升高,苏州青的 SOD 活性比短白梗升高的幅度大,这与王雅平等 (1993) 的研究结果一致。

References

- Fang Zhong-da. 1979. Methods for plant disease. Beijing: Agricultural Press: 164 - 173. (in Chinese)
- 方中达. 1979. 植物病研究方法. 北京: 农业出版社: 164 - 173.
- Ferguson I B, Watkins C B, Harman J E. 1983. Calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiology*, 71 (1): 182 - 186.
- Liu Xue-min, Chen Yu-fei, Dong Chang-jun. 2003. Research advances in relationship between tobacco resistance and protective enzymes activity. *Tobacco Science & Technology*, 186 (1): 43 - 46. (in Chinese)
- 刘学敏, 陈宇飞, 董长军. 2003. 烟草对赤星病的抗性与其防御酶系活性的关系. *烟草科技*, 186 (1): 43 - 46.
- Li Jing, Li Rong-qian, Yuan Wen-jing. 1991. On the change of enzyme activities of cucumber leaf infected by *Pseudoaeromonas cubensis* Rosw. *Acta Phytopathologica Sinica*, 21 (4): 277 - 283. (in Chinese)
- 李靖, 利容千, 袁文静. 1991. 黄瓜感染霜霉病菌后叶片中一些酶活性的变化. *植物病理学报*, 21 (4): 277 - 283.
- Li Lan-zhen, Zhao Hui-jie, Yang Hui-wu, Liu Hua-shan, Wang De-qin. 1999. The relationship between wheat rust and metabolism of active oxygen in leaves. *Plant Physiology Communications*, 35 (2): 115 - 117. (in Chinese)
- 李兰真, 赵会杰, 杨会武, 刘华山, 王德勤. 1999. 小麦锈病与活性氧代谢的关系. *植物生理学通讯*, 35 (2): 115 - 117.
- Lü Xiu-lan, Gou Lin, Gong Rong-gao. 2004. Biochemical indexes for resistance estimation of grape variety to downy mildew. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34 (6): 512 - 517. (in Chinese)
- 吕秀兰, 苟琳, 龚荣高. 2004. 葡萄品种对霜霉病抗性鉴定的生化指标研究. *植物病理学报*, 34 (6): 512 - 517.
- Song Rui-fang, Ding Yong-le, Gong Chang-rong, Xu Guang-hui, Han Xiao-zhe. 2007. Research advances in relationship between tobacco resistance and protective enzymes activity. *Chinese Agriculture Science Bulletin*, 23 (5): 309 - 313. (in Chinese)
- 宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣, 徐光辉, 韩晓哲. 2007. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展. *中国农学通报*, 23 (5): 309 - 313.
- Tang Zhang-cheng. 1999. Modern experimental manual of plant physiology. Beijing: Science Press: 317 - 318. (in Chinese)
- 汤章城. 1999. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社: 317 - 318.
- Wang Ya-ping, Liu Yi-qiang, Shi Lei. 1993. SOD activity of wheat varieties with different resistance to scab. *Acta Photophysiological Sinica*, 19 (4): 353 - 358. (in Chinese)
- 王雅平, 刘伊强, 施磊. 1993. 小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性. *植物生理学报*, 19 (4): 353 - 358.
- Xue Ying-long. 1985. Experimental manual of plant physiology. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers: 194 - 195. (in Chinese)
- 薛应龙. 1985. 植物生理实验手册. 上海: 上海科学技术出版社: 194 - 195.
- Xu Jian-hua, Li Rong-qian, Wang Jian-bo. 1995. Some changes of enzyme activities from susceptible and resistance cucumber cultivars after inoculation with *Cucumber wilt* Fusarium. *Acta Phytopathologica Sinica*, 25 (3): 239 - 242. (in Chinese)
- 徐建华, 利容千, 王建波. 1995. 黄瓜不同抗病品种感染镰刀菌枯萎病菌后几种酶活性的变化. *植物病理学报*, 25 (3): 239 - 242.
- Ye Fan, Hou Xi-lin, Yuan Jian-yu. 2007. Effects of heat stress on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation of non-heading Chinese cabbage seedlings. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 23 (2): 154 - 156. (in Chinese)
- 叶凡, 侯喜林, 袁建玉. 2007. 高温胁迫对不结球白菜幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响. *江苏农业学报*, 23 (2): 154 - 156.