

申姗姗, 侯喜林. 不结球白菜感染霜霉病菌后防御物质及酶的变化 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 23-26

## 不结球白菜感染霜霉病菌后防御物质及酶的变化

申姗姗, 侯喜林\*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 采用不同霜霉病抗性的不结球白菜自交系, 研究了其对霜霉病的抗性机制。结果表明: 在接种病原菌前, 不结球白菜健康叶片中木质素含量与霜霉病的抗性成正相关, 几丁质酶与霜霉病抗性没有明显的相关性。接种后抗病材料叶片中的木质素含量呈现出快速上升、下降、再上升、再下降的趋势, 分别在接种后 24 h 和 96 h 达到峰值; 而感病材料变化缓慢, 变化幅度小, 在 36 h 达到峰值。接种后抗病材料的几丁质酶变化迅速, 且长时间处于高活性, 在 48 h 达到峰值; 相比之下, 感病材料的酶活性增高的幅度小, 高活性维持时间短, 在 36 h 达到峰值。上述结果表明, 叶片中的木质素含量和几丁质酶活性的动态变化, 是植物抗性潜能被激活的结果, 是诱导抗性机制的一部分。

**关键词:** 不结球白菜; 霜霉病; 叶绿素; 可溶性糖; 木质素; SOD; 几丁质酶

中图分类号: S634.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2009) 01-0023-04

## Changes of protective substances and enzymes in non-heading Chinese cabbage after infection by downy mildew

SHEN Shan-na, HOU Xi-lin\*

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

**Abstract:** Inbred lines of non-heading Chinese cabbage with different resistance to downy mildew were conducted for studying the metabolism of resistance to downy mildew. As shown by the result, before the inoculation, the lignin contents in healthy leaves were positive correlated to the resistance to downy mildew of inbred lines of non-heading Chinese cabbage, while there was no obvious correlation between chitinase activities and the resistance to downy mildew of inbred lines. According to the results, after the inoculation, the lignin contents in resistant lines increased rapidly prior to decrease slowly, and then they increased again prior to decrease again, leading to two peaks at 24 h and 96 h after inoculation. The lignin contents in susceptible lines had a slow change with only one peak at 36 h after inoculation. The chitinase activities in resistant lines had a rapid change and a long time with high activities, resulting in a peak at 48 h after inoculation while the chitinase activities in susceptible lines had a slow change and a peak at 36 h after inoculation. The above results indicated that activation of resisted potential of plants led to the increase of lignin content and chitinase activities, which belonged to the metabolism of inducing resistance.

**Key words:** non-heading Chinese cabbage; downy mildew; chlorophyll; soluble sugar; lignin; SOD; chitinase

霜霉病 (*Peronospora parasitica*) 是不结球白菜 (*Brassica campestris* spp. *chinensis* Makino) 的重要病害。这种真菌性病害常引起白菜幼苗和成株叶片枯黄, 病斑多时互相连接可引起叶片大面积的枯死, 而且在合适的环境条件下, 可重复侵染, 引起病害流行, 可导致产量大幅度下降<sup>[1]</sup>。为了减轻病害长期施用农药, 不仅污染环境, 破坏生态平衡, 也严重威胁人们的身体健康。因此抗病性一直是不结球白菜最重要的育种目标之一。冷月强等<sup>[2]</sup>报道了不结球白菜接种霜霉病菌后多酚氧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶及  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的变化, 而其他有关不结球白菜抗霜霉病机制研究尚未见报道。研究表明, 可溶性糖、叶绿素和木质素含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、几丁质酶与霜霉病抗性有密切的关系<sup>[3-6]</sup>, 因此笔者采用苗期接种的方法研究了不结球白菜植株感染霜霉病菌后以上 5 个指标在 6 d 内的动态变化, 旨在为不结球白菜霜霉病的防治和抗病育种提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料及接种方法

供试材料为不结球白菜抗病自交系 014、001 和不结球白菜感病自交系 007、010 (由南京农业大学不结球白菜课题组提供)。014、001、007、010 在 4 叶 1 心期的病情指数分别为 25.2、31.1、67.8、63.2。

参考冷月强等<sup>[2]</sup>的方法接种霜霉病菌。将试材于 2006 年 4 月播种于穴盘中, 待到 4 叶 1 心期进行喷雾接种, 以喷清水为对照。在接种前 (0 h) 和接种后 12、24、36、48、72、96、120、144 h 分别取相同叶位的叶片保存在 -70 °C 冰柜中备用。

### 1.2 生理生化指标测定

可溶性糖含量测定采用苯酚法<sup>[7]</sup>; 叶绿素含量测定采用分光光度计法<sup>[7]</sup>; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定采用氮蓝四唑法<sup>[7]</sup>; 木质素含量测定采用半定量法<sup>[8]</sup>; 几丁质酶活性测定采用 Mukherjee 等<sup>[9]</sup>和史娟等<sup>[10]</sup>的方法。以上各指标每个处理均取样 3 次, 测定后取平均值。各指标的变化趋势均采用相对值表示, 即各指标对照值与接种后值之差占对照值的百分比。

### 1.3 统计分析方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行方差及标准误分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同材料感染霜霉病菌后叶片中 SOD 酶和几丁质酶活性变化

由表 1 可以看出, 在接种后 24 h 内, 抗病材料 014 和 001 的相对 SOD 酶活性变化不大, 24 h 后开始急剧上升, 48 h 出现活性高峰, 分别为 154.60% 和 98.35%, 这与其他接种时段下的相对 SOD 酶活性差异极显著, 48 h 以后则有不同程度的下降; 感病材料 007 和 010 在接种后 24 h 内相对 SOD 酶活性呈下降趋势, 24 h 后开始上升, 在 36 h 至 96 h 之间处于一个相对稳定的阶段, 在此期间差异显著性不大, 无明显的活性高峰, 96 h 之后, 相对 SOD 酶活性则开始下降。

接种病原菌后, 各自交系的相对几丁质酶活性均显著增加。抗病材料 014 和 001 在 48 h 时达到了峰值, 分别为 386.44% 和 426.00%, 且接种后几丁质酶的高活性维持时间长, 直至 144 h 时, 014 和 001 的相对酶活性仍为 229.79% 和 166.67%。感病材料 007 和 010 的相对几丁质酶活性也明显增加, 在 36 h 时达到了峰值, 分别为 170.83% 和 162.96%, 但与抗病材料相比, 酶活性增加的幅度小, 维持时间也比较短, 且酶活性在 144 h 内始终处于一个较低的水平 (表 1)。

表 1 接种霜霉病菌后不同材料 SOD 酶和几丁质酶相对活性

Table 1 SOD activity and chitinase activity at different time after inoculation by downy mildew in different materials

接种后时间/h Time after inoculation	SOD 酶活性/% SOD activity				几丁质酶活性/% Chitinase activity			
	014	001	007	010	014	001	007	010
0	2.77 <sup>il</sup>	5.08 <sup>gG</sup>	2.10 <sup>cG</sup>	2.10 <sup>eE</sup>	31.11 <sup>iH</sup>	22.50 <sup>hH</sup>	36.36 <sup>gG</sup>	31.57 <sup>gG</sup>
12	8.12 <sup>hH</sup>	12.18 <sup>fF</sup>	-9.72 <sup>dD</sup>	9.69 <sup>cdBG</sup>	252.38 <sup>fE</sup>	226.09 <sup>eE</sup>	78.38 <sup>eE</sup>	36.69 <sup>gG</sup>
24	12.08 <sup>gG</sup>	12.68 <sup>fF</sup>	-22.12 <sup>fF</sup>	-18.75 <sup>fF</sup>	220.00 <sup>hG</sup>	180.77 <sup>fF</sup>	141.46 <sup>cBC</sup>	139.02 <sup>cC</sup>
36	70.18 <sup>dD</sup>	54.58 <sup>eE</sup>	15.53 <sup>bB</sup>	11.92 <sup>bB</sup>	350.00 <sup>eB</sup>	360.87 <sup>bB</sup>	170.83 <sup>aA</sup>	162.96 <sup>aA</sup>
48	154.60 <sup>aA</sup>	98.35 <sup>aA</sup>	19.82 <sup>aA</sup>	11.67 <sup>bcB</sup>	386.44 <sup>aA</sup>	426.00 <sup>aA</sup>	144.19 <sup>bB</sup>	114.29 <sup>eE</sup>
72	115.17 <sup>bB</sup>	88.98 <sup>bB</sup>	14.09 <sup>bB</sup>	21.43 <sup>aA</sup>	310.71 <sup>dC</sup>	353.85 <sup>cC</sup>	124.39 <sup>dD</sup>	75.00 <sup>fF</sup>
96	107.35 <sup>cC</sup>	76.53 <sup>cC</sup>	22.00 <sup>aA</sup>	7.14 <sup>dCD</sup>	354.17 <sup>bB</sup>	362.50 <sup>bB</sup>	139.39 <sup>cC</sup>	145.24 <sup>bB</sup>
120	50.21 <sup>eE</sup>	68.49 <sup>dD</sup>	0.00 <sup>cC</sup>	4.41 <sup>eDE</sup>	265.39 <sup>eD</sup>	341.30 <sup>dD</sup>	62.79 <sup>fF</sup>	125.00 <sup>dD</sup>
144	36.55 <sup>fF</sup>	52.92 <sup>eE</sup>	-13.30 <sup>eE</sup>	18.07 <sup>fF</sup>	229.79 <sup>eF</sup>	166.67 <sup>gG</sup>	77.14 <sup>eE</sup>	75.00 <sup>fF</sup>

注: 不同上标大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Note: The different superscript capital and small letters respectively represent for different significantly at 0.01 and 0.05 levels. The same as follows.

### 2.2 不同材料感染霜霉病菌后叶片中叶绿素含量变化

在接种前 014、001、007、010 的叶绿素含量分别为 12.59、10.13、7.40、7.60 mg · g<sup>-1</sup>, 说明不结球白菜不同材料健康叶片中的叶绿素含量与抗病性有一定的正相关性。接种病原菌后, 抗病材料 014

和001叶片中的相对叶绿素含量迅速升高, 在36 h和96 h时分别出现了2个峰值, 其相对叶绿素含量和其他时段的相对叶绿素含量差异极显著。而感病材料007和010叶片相对叶绿素含量的变化比较缓慢, 接种后缓慢上升, 在48 h内与抗病材料叶片相对叶绿素含量相比一直处于一个较低的水平, 在96 h达到了峰值, 分别为32.21%和32.67% (表2)。

2.3 不同材料感染霜霉病菌后叶片中可溶性糖和木质素含量变化

在接种前014、001、007、010的可溶性糖含量分别为1.19、1.89、2.42、2.02  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 说明

不结球白菜不同材料健康叶片中的可溶性糖含量与抗病性有一定的负相关性。由表3可以看出, 接种后各材料相对可溶性糖含量的变化趋势基本一致, 即降低、升高、再降低, 而且均是在24 h迅速下降, 48 h出现峰值, 而后均大幅度下降。但抗性不同的材料在不同时段其可溶性糖含量的变化存在一定差异。各材料在接种后48 h相对可溶性糖含量出现峰值, 与其他时段的相对可溶性糖含量差异极显著, 且各个时段间差异均极显著, 说明接种后, 各材料叶片中的相对可溶性糖含量变化幅度较大。

在接种前014、001、007、010的木质素含量分别为1.62%、1.33%、0.78%、1.18%, 说明不结球白菜不同材料健康叶片中的木质素含量与抗病性有一定的正相关性。接种后24 h抗病材料014和001叶片内木质素含量出现第1个峰值, 分别为29.88%和35.94%, 然后开始下降, 48 h后又开始上升, 96 h时达到第2个峰值, 分别为21.12%和22.39%, 之后再次下降。014和001在24 h和96 h出现的2个峰值与其他时段的相对木质素含量差异极显著。而感病材料007和010在受到病原菌侵染后, 相对木质素含量12 h内基本没有发生变化, 在接种后36 h达到了峰值, 这与其他时段的相对木质素含量差异极显著, 36 h后木质素含量缓慢下降直至144 h (表3)。

表2 接种霜霉病菌后不同材料叶绿素含量

Table 2 Chlorophyll content at different time after inoculation by downy mildew in different materials

接种后时间/h Time after inoculation	叶绿素含量/% Chlorophyll content			
	014	001	007	010
0	0.00 <sup>hH</sup>	1.30 <sup>H</sup>	-0.40 <sup>gF</sup>	0.00 <sup>eD</sup>
12	4.27 <sup>gG</sup>	2.80 <sup>hG</sup>	-4.94 <sup>hG</sup>	1.35 <sup>eD</sup>
24	19.83 <sup>dD</sup>	9.71 <sup>gF</sup>	2.50 <sup>fE</sup>	9.86 <sup>dC</sup>
36	32.71 <sup>aA</sup>	33.80 <sup>bB</sup>	10.53 <sup>dC</sup>	15.80 <sup>eB</sup>
48	26.67 <sup>cC</sup>	22.58 <sup>cC</sup>	16.00 <sup>bB</sup>	15.79 <sup>eB</sup>
72	15.19 <sup>eE</sup>	13.10 <sup>fE</sup>	12.66 <sup>cC</sup>	30.88 <sup>aA</sup>
96	30.25 <sup>bB</sup>	36.51 <sup>aA</sup>	32.21 <sup>aA</sup>	32.67 <sup>aA</sup>
120	13.14 <sup>eF</sup>	16.28 <sup>dD</sup>	16.67 <sup>bB</sup>	17.82 <sup>beB</sup>
144	11.60 <sup>fF</sup>	14.26 <sup>eE</sup>	5.56 <sup>eD</sup>	18.11 <sup>bB</sup>

表3 接种霜霉病菌后不同材料可溶性糖和木质素含量

Table 3 Soluble sugar and lignin content at different time after inoculation by downy mildew in different materials

接种后时间/h Time after inoculation	可溶性糖含量/% Soluble sugar content				木质素含量/% Lignin content			
	014	001	007	010	014	001	007	010
0	0 <sup>eE</sup>	0.53 <sup>dD</sup>	0.42 <sup>bB</sup>	0 <sup>cC</sup>	-3.09 <sup>iI</sup>	-1.50 <sup>fF</sup>	-3.85 <sup>gF</sup>	1.70 <sup>dD</sup>
12	2.73 <sup>eE</sup>	-7.25 <sup>eE</sup>	1.74 <sup>bB</sup>	-4.46 <sup>dD</sup>	13.54 <sup>fF</sup>	11.36 <sup>eE</sup>	1.23 <sup>fE</sup>	3.42 <sup>dD</sup>
24	-19.67 <sup>gG</sup>	-13.19 <sup>fF</sup>	-29.80 <sup>eE</sup>	-14.43 <sup>eE</sup>	29.88 <sup>aA</sup>	35.94 <sup>aA</sup>	-1.14 <sup>eF</sup>	11.11 <sup>cC</sup>
36	48.21 <sup>bB</sup>	6.15 <sup>cC</sup>	-3.72 <sup>cC</sup>	5.71 <sup>bB</sup>	23.08 <sup>bB</sup>	31.54 <sup>bB</sup>	33.75 <sup>aA</sup>	27.93 <sup>aA</sup>
48	60.16 <sup>aA</sup>	42.86 <sup>aA</sup>	11.43 <sup>aA</sup>	23.68 <sup>aA</sup>	11.59 <sup>gG</sup>	10.37 <sup>eE</sup>	29.87 <sup>bB</sup>	18.10 <sup>bB</sup>
72	36.98 <sup>cC</sup>	20.44 <sup>bB</sup>	-25.57 <sup>dD</sup>	-5.45 <sup>dD</sup>	19.11 <sup>dD</sup>	17.42 <sup>dD</sup>	26.92 <sup>cB</sup>	17.70 <sup>bB</sup>
96	15.24 <sup>dD</sup>	-18.97 <sup>gG</sup>	-37.90 <sup>fF</sup>	-25.58 <sup>fF</sup>	21.12 <sup>cC</sup>	22.39 <sup>cC</sup>	19.51 <sup>dC</sup>	11.11 <sup>cC</sup>
120	-13.04 <sup>fF</sup>	-53.04 <sup>hH</sup>	-57.44 <sup>gG</sup>	-24.74 <sup>fF</sup>	16.56 <sup>eE</sup>	17.29 <sup>dD</sup>	12.82 <sup>eD</sup>	9.01 <sup>cC</sup>
144	-19.44 <sup>gG</sup>	-69.61 <sup>iI</sup>	-67.98 <sup>hH</sup>	-40.39 <sup>gG</sup>	8.03 <sup>hH</sup>	10.95 <sup>eE</sup>	18.67 <sup>dC</sup>	0.85 <sup>dD</sup>

3 结论与讨论

SOD 作为活性氧清除剂, 其活性与抗性密切相关<sup>[3,11]</sup>。本试验中在病菌侵染后, 抗病材料 SOD 酶活性呈现缓慢上升、快速上升、下降的趋势, 而感病材料呈现出下降、上升、再下降的趋势, 抗病材料与感病材料相比, 反应快, 幅度大, 且酶的高活性维持时间较长。试验结果证明, SOD 酶活性在不结球白菜与霜霉菌的互动过程中动态变化或酶活性的消长可能是寄主细胞维持自由基产生与消除之间的平衡, 是保护细胞膜免遭破坏所必需的一种机制。

叶绿素含量与霜霉病的抗性关系已有报道<sup>[4,12]</sup>。本试验结果与已有报道一致, 即在未受病原菌侵染前, 不结球白菜叶片中的叶绿素含量与自交系对霜霉病的抗性呈正相关; 在接种后, 叶绿素含量均升高且出现峰值。因此, 通过比较不结球白菜不同品种叶色的深浅变化来判断抗病性强弱, 是有一定参考价值的。

本试验中,接种前可溶性糖含量与自交系对霜霉病的抗性呈负相关,这与云兴福<sup>[5]</sup>的研究结果一致,但与丁九敏等<sup>[3]</sup>和刘庆元等<sup>[13]</sup>的研究结果相反;接种后不结球白菜各自交系的可溶性糖含量均呈现出下降、上升、再下降的趋势,说明病原菌的生长及植物的防卫反应对于可溶性糖是处于竞争之中的,抗病材料受侵染后,防卫反应迅速,代谢速度加快,使得糖主要供给植物生长,增强其抗性。

木质素的测定结果表明:接种前木质素含量与抗病性有一定的正相关性,这与骆桂芬等<sup>[6]</sup>的研究结果一致;接种后抗病材料的木质素含量迅速升高,分别在24 h和96 h达到峰值,而感病材料反应比较缓慢,在36 h时达到峰值,随后便一直处于下降趋势。木质素作为植物细胞壁的基本组成成分之一,在受到病原菌侵染后,可以增加细胞壁抗真菌穿透的能力,限制病原菌向寄主的扩散,同时限制了水和营养物质从寄主向真菌扩散,限制了病原菌的生长;另外木质素低分子质量酚类前体以及多聚作用时产生的游离基还可以钝化病原真菌的细胞<sup>[14-15]</sup>,从而起到增加植物抗病性的作用。

几丁质酶作为一种病原相关蛋白,它对病原菌的抗性已有很多报道<sup>[9-10,16]</sup>。本试验的结果显示:接种霜霉病菌后,各材料的几丁质酶活性均明显升高,抗病材料在48 h时达到峰值,而感病材料在36 h时达到峰值。几丁质酶能增强植物抗性可能是:几丁质酶可以通过水解真菌的菌丝生长点细胞壁中的几丁质,从而破坏细胞新物质的积累,致使真菌死亡;几丁质酶能分解几丁质产生N-乙酰葡萄糖胺或几丁寡糖,这种含氮的低聚糖可以进一步诱导几丁质酶活性;几丁质酶还具有调节植物细胞木质素代谢的功能。

#### 参考文献:

- [1] 李明远. 十字花科蔬菜霜霉病的发生与防治 [J]. 当代蔬菜, 2004(8): 38-39
- [2] 冷月强, 侯喜林. 不结球白菜接种霜霉病菌后防御酶活性的变化 [J]. 江苏农业学报, 2006, 22(3): 305-307
- [3] 丁九敏, 高洪斌, 刘玉石, 等. 黄瓜霜霉病抗性与叶片中生理生化物质含量关系的研究 [J]. 辽宁农业科学, 2005(1): 11-13
- [4] 顾振芳, 王卫青, 朱爱萍, 等. 黄瓜对霜霉病的抗性与叶绿素含量、气孔密度的相关性 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(4): 381-384
- [5] 云兴福. 黄瓜组织中氨基酸、糖和叶绿素含量与其对霜霉病抗性的关系 [J]. 华北农学报, 1993, 8(4): 52-58
- [6] 骆桂芬, 崔俊涛, 张莉. 黄瓜叶片中糖和木质素含量与霜霉病诱导抗性的关系 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 65-69
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 46-123
- [8] 杨冬冬, 黄丹枫. 西瓜嫁接体发育中木质素合成及代谢相关酶活性的变化 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(2): 290-294
- [9] Mukherjee G, Sen S K. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10 [J]. Current Microbiology, 2006, 53: 265-269
- [10] 史娟, 胡景江, 王红玲, 等. 霜霉病对葡萄细胞壁水解酶的诱导作用与寄主抗病性的关系 [J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 42-44
- [11] 高洪波, 郭世荣, 刘艳红, 等. 低氧胁迫下  $Ca^{2+}$ 、 $La^{3+}$  和 EGTA 对网纹甜瓜幼苗活性氧代谢的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 17-21
- [12] 刘会宁, 朱建强, 万幼新. 几个欧亚种葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定 [J]. 上海农业学报, 2001, 17(3): 64-67
- [13] 刘庆元, 张穗, 李久禄, 等. 黄瓜品种对霜霉病的抗性机理 [J]. 华北农学报, 1993, 8(1): 70-75
- [14] 程智慧, 李玉红, 孟焕文, 等. BTH 诱导黄瓜幼苗对霜霉病的抗性与细胞壁 HRGP 和木质素含量的关系 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 935-940
- [15] Milstein O, Vered Y, Shragina L, et al. Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus* [J]. Arch Microbiology, 1983, 135: 147-154
- [16] Shternshis M V, Beljaev A A, Shpatova T V, et al. The effect of chitinase on *Didymella applanata*, the causal agent of raspberry cane spur blight [J]. Biology Control, 2006, 51: 311-322

责任编辑: 范雪梅