

文章编号: 1007- 2985(2006) 03- 0078- 04

黄瓜花叶病毒感染引起甜瓜植株苯丙氨酸解氨酶和叶绿素的变化

赵荣乐

(北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘要: 研究黄瓜花叶病毒新疆株(cucumber mosaic virus- XJ, CMV- 2- XJ) 感染抗性不同的甜瓜品种后苯丙氨酸解氨酶和叶绿素含量的变化, 结果表明: 与健康对照相比, 受感染植株的酶活性均有所增高, 但抗性品种 新玉 增高的幅度是感性品种 网纹香 的 2 倍, 酶活性峰早出现 12 d, 即抗性品种酶活性增高幅度大, 酶活性峰出现早; 叶绿素的变化则与抗性呈负相关, 抗性品种 新玉 受 CMV- XJ 感染后的叶绿素含量与健康对照差异不大, 而感性品种 网纹香 的叶绿素含量则比健康对照下降了 62.9%. 说明苯丙氨酸解氨酶和叶绿素含量的变化均与甜瓜品种对 CMV- 2- XJ 的抗性呈现规律性的相关性, 这种规律性可用于甜瓜品种对 CMV- XJ 抗性鉴定的生物化学分析.

关键词: 黄瓜花叶病毒新疆株(CMV- 2); 甜瓜; 苯丙氨酸解氨酶; 叶绿素

中图分类号: S436. 42

文献标识码: A

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV- 2) 是世界范围的葫芦科植物的重要病毒^[1], 在我国也发现了这种病毒^[2]. CMV- 2 对包括甜瓜在内的葫芦科植物的生产构成很大威胁^[1,3], 已有不少论文报道了对该病毒的研究^[2-4], 但未见关于该病毒感染植物后引起的生物化学变化的研究报道, 笔者研究了黄瓜花叶病毒- 2 新疆株(CMV- 2- XJ) 感染抗性不同的甜瓜品种后, 植物重要的防御酶 苯丙氨酸解氨酶和叶绿素含量的变化, 以探讨该病毒的致病机理和寄主植物的抗病特征.

1 材料和方法

1.1 病毒毒源

黄瓜花叶病毒新疆株(CMV- XJ) 系从田间自然发病并具有典型黄化花叶症状的甜瓜(*Cucumis melo*) 病株分离, 并经 SDS 双向免疫扩散和酶联免疫吸附试验(ELISA) 鉴定为 CMV- XJ^[2], 该毒株维持于西葫芦(*Cucurbita pepo*) 植株, 并置于温室里严格的防虫网罩内, 毒源植株为子叶期摩擦接种 CMV- XJ 后 7~ 21 d 的西葫芦植株.

1.2 供试植物和病毒接种

供试甜瓜(*Cucumis melo*) 品种为对 CMV- XJ 的感性品种 网纹香 和抗性品种 新玉, 将供试植物播种于防虫温室内的消毒土壤中, 幼苗第 1 片真叶展开时, 以接种缓冲液浓度(0.01 mol L⁻¹ 磷酸盐缓冲液, pH 值 7.0) 制备的 CMV- XJ 感染西葫芦粗汁液摩擦接种供试植物子叶, 并以健康西葫芦粗汁液同样处理

收稿日期: 2006- 03- 28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3880581); 教育部留学回国人员科研基金资助项目

作者简介: 赵荣乐(1945-), 女, 江苏省徐州市人, 北京师范大学大学生命科学学院教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究.

的供试植株为健康对照. 接种后 40 d 内, 每隔 3 d 取第 1 片真叶进行病毒相对浓度、苯丙氨酸解氨酶和叶绿素含量测定, 每个测定项目均进行 20 株相同处理样品测定后, 取平均值作为测定结果.

1.3 病毒相对浓度测定

以间接酶联免疫吸附试验(ELISA)测定感病植株叶组织中的病毒相对浓度^[2], 第 1 抗体为兔抗 CMV-XJ 血清, 第 2 抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(Sigma), 对硝基苯酚磷酸盐底物显色, 以 405 nm 波长在 DG3201 型酶联免疫检测仪测定光吸收值 A , 并以 20 株相同处理的感病植株的 ELISA 光吸收值的平均值表示感染组织的病毒相对浓度.

1.4 苯丙氨酸解氨酶活性测定

待测叶组织与硼酸缓冲液(浓度 0.01 mol L^{-1} , pH 值 8.8, 内含 5 mmol L^{-1} 巯基乙醇)在冰浴上研磨, 冷冻离心($8\ 000 \text{ g}$, 15 min , 4°C), 取上清液按文献[5]方法测定酶活性, 在 0.1 mL 上清液中加入 0.9 mL H_2O , 30 mol L^{-1} 苯丙氨酸, 100 mol L^{-1} 硼酸缓冲液(pH 值 8.8), 30°C 保温 10 min , 后加 0.25 mL 5 mol L^{-1} HCl 终止反应. 同时, 对健康样品进行同样处理, 测定所有样品在波长为 290 nm 时的光吸收值 A , 以 $A_{290 \text{ nm}}$ 每分钟增加 0.01 为 1 个酶活性单位.

1.5 叶绿素含量测定

按文献[6]的方法进行. 待测叶组织与 15 mL 85% 的丙酮在冰浴中研磨匀浆, 冷冻离心($8\ 000 \text{ g}$, 15 min , 4°C), 取上清液测定其在波长 660.0 nm 和 642.5 nm 时的光吸收值 A , 叶绿素质量浓度(mg L^{-1}):

$$c = 8.02A_{660.0} + 20.21A_{642.5}.$$

2 结果

2.1 病毒相对浓度

感性品种 网纹香 和抗性品种 新玉 接种 CMV-XJ 后, 病毒相对浓度的变化见图 1.

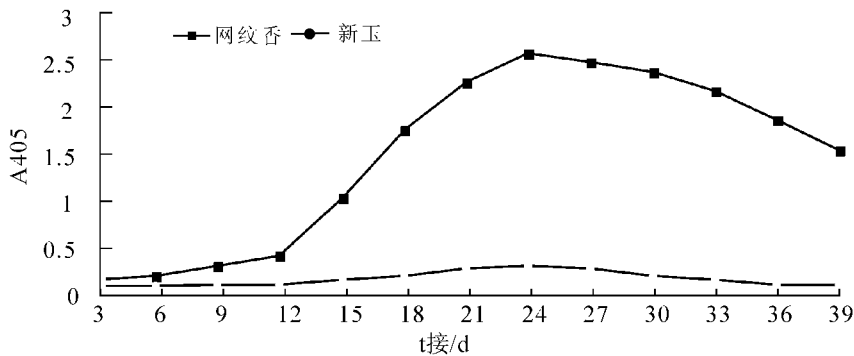


图 1 网纹香 和 新玉 接种 CMV-XJ 后第一片真叶中病毒相对浓度

由图 1 可知: CMV-XJ 在 2 个品种中增殖的趋势基本相同, 在病毒接种后病毒浓度逐渐上升直至第 24 d 达到最高峰, 然后逐渐下降; 但病毒相对浓度在 2 个品种中差异极大, 在病毒浓度高峰时, 感性品种 网纹香 的病毒浓度是抗性品种 新玉 的 10 倍, 外观症状的严重程度与病毒相对浓度呈正相关, 并与 2 个品种对 CMV-XJ 的抗性差异相吻合.

2.2 苯丙氨酸解氨酶活性测定

感性品种 网纹香 和抗性品种 新玉 接种 CMV-XJ 后和健康对照植株在 39 d 期间内苯丙氨酸解氨酶活性测定结果见图 2. 图 2 显示: 所有接种病毒植株的酶活性均比健康对照增高, 并都出现 1 个活性峰; 但活性增高的幅度和酶活性峰出现的时间却差异甚大, 感性品种 网纹香 的酶活性增高速度缓慢, 酶活性峰出现在接种后第 24 d, 此后酶活性逐渐下降而与健康对照接近; 而抗性品种 新玉 酶活性增高迅速, 酶活性峰出现在接种后第 12 d, 即抗性品种 新玉 的酶活性峰比感性品种 网纹香 早出现 12 d; 酶活性峰时, 新玉 的酶活性是 网纹香 的 2 倍, 并一直保持在高水平上, 呈现了感染 CMV-XJ 后抗性品种的苯丙

氨酸解氨酶活性峰出现得早,酶活性增高幅度大,并在高活性水平上长时间维持的基本规律。

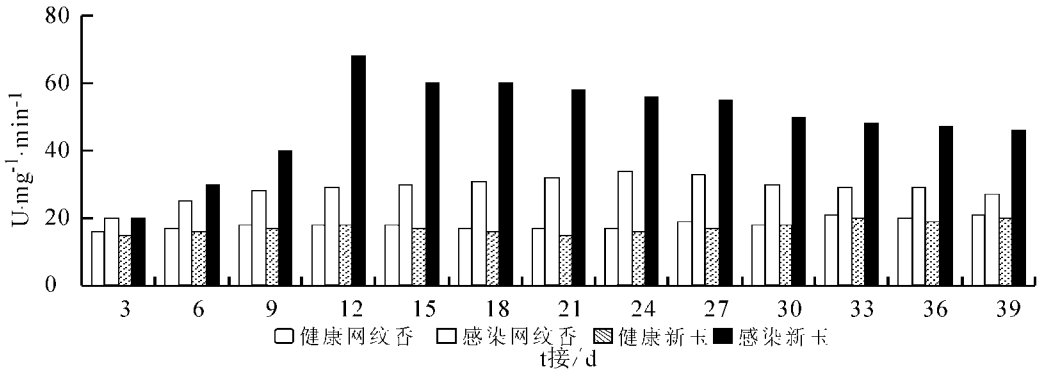


图2 网纹香和新玉接种CMV-XJ后第一片真叶中苯丙氨酸解氨酶活性变化

2.3 叶绿素含量测定

感性品种网纹香和抗性品种新玉接种CMV-XJ后和健康对照植株在39d期间内叶绿素质量浓度测定结果见图3。图3显示:感性品种网纹香的叶绿素在接种CMV-XJ后第9d开始下降,至第12d时,叶绿素迅速下降,接种后第24d时,叶绿素下降到最低点,与健康对照植株相比,叶绿素下降了62.9%,此时正是病毒浓度达到最高峰;此后,叶绿素虽然略有回升,但仍大大低于健康对照株;抗性品种新玉的叶绿素在接种CMV-XJ后的39d时间内始终只比健康对照略低,但差异不显著($p < 0.05$),呈现了对CMV-XJ的抗性品种感染CMV-XJ后,叶绿素受到的影响很小,而感性品种则受到很大影响导致叶绿素大幅度下降的规律。

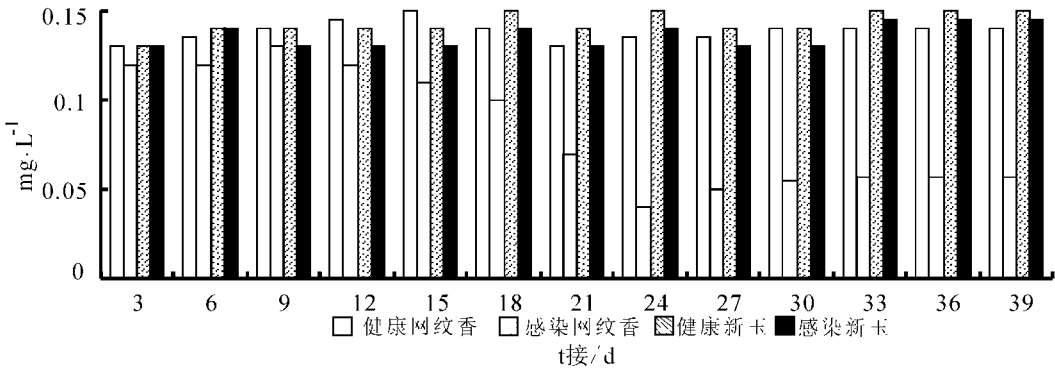


图3 网纹香和新玉接种CMV-XJ后和健康对照第一片真叶中叶绿素含量变化

3 讨论

本研究揭示了CMV-XJ感染甜瓜后苯丙氨酸解氨酶和叶绿素的变化规律。苯丙氨酸解氨酶是植物次生代谢中的关键酶,它催化苯丙氨酸脱氨基后产生肉桂酸。该产物是一些植保素成分的前体物质^[7],它最终转变为木质素,因此它是植物细胞内木质素生成和积累有关的防御酶。它可由病原微生物、机械损伤或光等因子诱导合成^[8]。植物抗病的许多功能物质的产生与该酶关系密切。显然,CMV-XJ入侵新玉品种,通过某种信号传递系统,迅速启动苯丙氨酸解氨酶表达系统,导致苯丙氨酸解氨酶活性迅速增高,产生大量木质素并沉积在细胞壁周围。由于细胞木质化增强,病毒在细胞间的扩散受到限制,病毒被限制在一定的细胞范围之内,因此,病毒相对浓度也就很低,因而对叶绿素合成的影响很小。所以,叶绿素含量与健康植株差异不大,亦对植株的光合作用影响不大。而在CMV-XJ入侵感性品种网纹香时,由于CMV-XJ的侵染破坏效应令细胞防御酶苯丙氨酸解氨酶系统未能及时作出反应就已打破了寄主的代谢平衡,因而接种初期苯丙氨酸解氨酶活性仅缓慢升高。直到寄主表现明显症状时才略有升高,而此时,由于细胞木质化程度较低,病毒在植物体内广泛扩散,病毒相对浓度急剧上升,因而极大地抑制了叶绿素的合成,从而极大地降低了植株的光合作用,造成甜瓜产量和质量大大下降。进一步的分子生物学的研究将会揭示CMV-XJ感染不同抗性的甜瓜品种后,苯丙氨酸解氨酶和叶绿素发生变化的分子生物学机制和本质,更深层

次地揭示 CMV-XJ 浸染甜瓜后的致病机理。可以肯定的是, CMV-XJ 感染甜瓜后苯丙氨酸解氨酶和叶绿素的变化作为甜瓜品种对 CMV-XJ 的抗性鉴定的生物化学判断指标之一是可行的。

参考文献:

- [1] 田波, 龚祖坝. 病毒与农业 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] 郑光宇, 王志民, 李国玄, 等. 新疆哈密瓜病毒病的免疫电子显微镜诊断 [J]. 植物病理学报, 1984, 14(1): 47-50.
- [3] FRANCKI R I B, HATA H. Cucumber Mosaic Virus [A]. In: Commonw. Mycol Inst Assoc Appl Biol Descriptions of Plant Viruses [C]. United Kingdom: WM Culross and Son Ltd, 1979, (213).
- [4] FRANCKI R I B, HATA T. Cucumber Mosaic Virus-Variation and Problem of Identification [J]. Acta Horticulture, 1980, 110: 167-174.
- [5] HYODO H, YANG S F. Ethylene-Enhanced Synthesis of Phenylalanine Ammonialyase in Pea Seedlings [J]. Plant Physiology, 1971, 48(6): 765-769.
- [6] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [7] JANE K, KOUKOL J, CONN E E. The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 1961, 236(10): 2692-2698.
- [8] HAGA M, HARUYAMA T, KANO H, et al. Dependence on Ethylene of the Induction of Phenylalanine Ammonialyase Activity in Rice Leaf Infected with Blast Fungus [J]. Agri. Biol. Chem., 1988, 5(4): 943-950.

Changes of Phenylalanine Ammonialyase and Chlorophyll in Muskmelon Plants Infected by CMV-Xinjiang Isolate

ZHAO Rong-le

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Changes of phenylalanine ammonialyase and chlorophyll in muskmelon cultivars of different resistance to cucumber mosaic virus-XJ (CMV-XJ) were investigated. Compared with healthy control, the enzyme activity increased in all infected muskmelon plants, but the increase in enzyme activity for resistant cultivar Xinyu was two times of that for susceptible cultivar Wangwenxiang and the peak of enzyme activity for Xinyu appeared 12 days earlier, that is bigger increase range of enzyme activity and earlier enzyme activity peak for resistant cultivar. But the change of chlorophyll was negatively related with the resistance to the virus; after infection by CMV-XJ, the chlorophyll content of resistant cultivar Xinyu is not different significantly from that of the healthy control, but the chlorophyll content of susceptible cultivar Wangwenxiang decreased by 62.9% compared with the healthy control. There is regular relation between resistance of the muskmelon cultivar and changes of phenylalanine ammonialyase and chlorophyll after infection by CMV-XJ. The regularity can be used as the biological criterion for the determination of susceptibility and resistance to CMV-XJ for muskmelon cultivars.

Key words: cucumber mosaic virus-XJ; muskmelon; phenylalanine ammonialyase; chlorophyll

(责任编辑 易必武)