

紫珍香葡萄自交后代对霜霉病抗性鉴定及叶片相关生化指标分析

郭修武, 张娜, 冯喆

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 在葡萄霜霉病盛发期, 通过田间自然鉴定和对感病前后叶片中 PPO、PAL 的活性进行测定, 研究紫珍香自交后代的 6 个株系对霜霉病的抗性。结果表明: PPO、PAL 2 个防御酶活性与供试葡萄抗性间存在正相关, 6 个供试株系对霜霉病的抗性存在显著差异, 其中 08-88 的抗性最强, 显著高于抗病亲本紫珍香; 08-42、08-51 的抗病性中等; 08-141、08-96、08-13 的抗病性最弱, 且显著低于对照。

关键词: 紫珍香葡萄; 自交后代; 霜霉病; 抗性鉴定; PPO; PAL

中图分类号: S 633. 103. 4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0051-04

葡萄霜霉病(*Plasmopara viticola*)起源于美洲, 是葡萄主要病害之一^[1], 主要危害叶片, 严重时叶片焦枯早落, 减产 30%~50%, 重者达 80%以上^[2]。天气潮湿或湿度过高时, 在病斑背面产生白色霜霉层, 这就是病原菌的孢子囊梗和孢子囊^[3]。葡萄霜霉病菌为葡萄真菌病害中最严重的病害病菌。生产中除应用栽培措施防治外, 主要采用化学防治。但是化学防治的昂贵投资和环境公害, 迫使人们寻求新的防治途径: 选育抗病种类或品种, 因而选育和合理利用抗病品种是综合防治葡萄霜霉病的最佳途径。选择抗病品种在霜霉病发病严重的地区加以推广, 也可作为抗霜霉病育种的原始材料加以利用。

植物受到病原物侵染时, 体内一系列防御酶会发生某些变化。参与酚类物质氧化的多酚氧化酶(PPO)与抗病性反应的关系已有较多报道^[1,5]。在植物抗病反应的次生代谢中, 苯丙烷类代谢是重要的代谢途径之一, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷代谢途径的关键酶, 研究发现在不同的植物-病原物互作中植物 PAL 活性有所增强, 伴随着 PAL 活性升高有木质素的积累及酚类物质和植保素的合成, 因此认为 PAL 与植物抗病性有着密切关系^[6,8]。

该研究通过田间自然发病对 6 个紫珍香自交后代组合的霜霉病抗性进行了鉴定, 并测定了供试组合感病前后的主要生化指标(PPO、PAL), 研究结果报道如下。

1 材料与方法

第一作者简介: 郭修武(1959-), 男, 教授, 博士生导师, 现主要从事果树资源与遗传育种及果树栽培生理等方向的研究工作。
E-mail: guoxw1959@163.com。
基金项目: 辽宁省重点科技攻关资助项目(2008204003)。
收稿日期: 2009-02-20

1.1 试验材料

该试验于 2008 年 7 月在沈阳农业大学葡萄试验园进行, 以欧美杂品种紫珍香自交后代的 6 个株系为试材, 亲本紫珍香为对照(CK), 供试株系分别有: 08-96、08-13、08-141、08-42、08-88、08-42。对供试株系的抗性进行了田间自然鉴定和感病前后叶片中生化指标 PPO、PAL 活性进行了研究。试验期间, 所用试材田间管理一致。

1.2 试验方法

1.2.1 田间自然鉴定 在霜霉病发生过程中, 以试验地内的紫珍香为对照, 随机选取非边缘位置且长势大致相同的植株进行调查。单株小区, 3~5 次重复, 以叶片为调查对象, 发病率和病情指数为指标。在发病过程中, 多次于发病盛期对叶片的感病情况进行调查, 对选中植株的全部叶片或生长势具有代表性的某枝上的叶片(叶片过多时)进行调查, 记载发病的叶片数和被调查的总叶数, 根据叶片感染霜霉病的程度分级记载, 标准为: 0 级: 叶片无病斑; 1 级: 0< 病斑面积占叶面积≤10%; 2 级: 10%< 病斑面积占叶面积≤30%; 3 级: 30%< 病斑面积占叶面积≤60%; 4 级: 60%< 病斑面积占叶面积≤80%; 5 级: 病斑几乎布满叶片或叶片枯死。

1.2.2 防御酶活性测定 取样: 感病前和感病后, 每组合分别取 10 片叶速冻于-20℃备用。供测酶活性。粗酶液的提取: 每处理取样 0.5 g, 3 次重复。取出冰箱中的样品, 放入预冷的研钵中, 加入 3 mL 硼酸缓冲液, 冰浴充分后研磨, 转移至预冷的离心管, 10 000 rpm, 4℃离心 20 min, 上清液即为酶粗提取液。将酶粗提取液迅速倒出, 放入-20℃冰箱中保存待用。多酚氧化酶(PPO)活性测定: 参照李靖(1991)方法进行测定。将酶粗提取液 40 μL 用 0.1 mol/L pH 6.8 的含 0.02 mol/L 邻苯二酚的 PBS 稀释 6 倍后, 混合均匀, 于 30℃水浴中反应 2 min, 测量 398 nm 波长下吸光值的变化, 以不加酶液而

加相同体积提取液的 PBS 为空白对照, 以 1 min OD₃₉₈值变化 0.01 为 1 个酶活单位, 用 $U \cdot mg^{-1} FW$ 表示酶活性。每个样品重复 3 次。苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定, 参照 Kogel K H(1992)及薛应龙(1983)等方法, 略有改动。取酶粗提液 40 μL , 加入 0.6 mL 的 0.05 mol/L pH 8.8 硼酸缓冲液, 0.1 mL 的 0.01 mol/L 苯丙氨酸溶液, 加入 4 mL 水, 混匀后, 在 40℃水浴中反应 15 min 后, 于冰浴中终止反应, 在 290 nm 处, 以不加酶的为空白对照在 290 nm 处测吸光值, 在上述条件下, 1 h 使 OD 值变化 0.01 的酶量定为 1 个酶活力单位, 计算酶活比活性 $U \cdot \mu g^{-1} pro$, 每个样品重复 3 次。

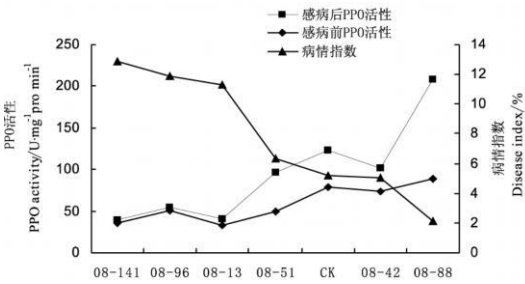


图 1 PPO 活性与抗病性的相关性
Fig. 1 Realtion between PPO activity and resistance

表 1 叶片病情指数比较

Table 1 Comparison of disease indexes of leaves			
株系	病情指数	LSR 检测(LSR test)	
Strain	Disease index	5%	1%
08-141	12.84	a	A
08-96	11.85	a	A
08-13	11.28	a	A
08-51	6.29	b	B
CK	5.16	b	B
08-42	5.08	b	B
08-88	2.11	c	C

从表 2 可以看出, 各株系叶片的感病指数存在一定程度差异, 其中 08-141、08-96、08-13 的叶片感病性最强; 08-51、08-42 的叶片感病性中等, 且 08-42 的感病性低于对照, 说明 08-42 的抗病性强于对照; 08-88 的叶片感病性最弱, 抗病性最强, 且抗病性明显强于对照。

2.2 紫珍香自交后代各株系叶片的发病率比较

从表 3 可以看出, 08-141、08-96 与 08-13、08-51、08-42、08-88 存在显著差异; 08-51、08-42 之间无显著差异; 08-88 极显著高于对照。根据表 3 方差分析结果, 可将供试株系对霜霉病的抗病性归为 5 类: (1)高感(HS): 08-141、08-96; (2)中感(S): 08-13; (3)中抗(MR): 08-51、08-42; (4)抗病品种(R): 紫珍香(CK); (5)高抗(HR): 08-88。

2.3 PPO 活性与抗病性的相关性

2 结果与分析

2.1 不同株系叶片的病情指数比较

为了更好的显示出紫珍香自交后代各株系对霜霉病的抗性, 采用感病性分级的方法进行比较。首先计算出最小显著差数(LSD=2.7562, P=0.01), 然后将供试组合分为 3 个级别: 1 级低感株系: 这一级别中供试株系的病情指数下限为最抗病株系的病情指数 A(2.11), 上限为 A+LSD(2.7562)=4.87; 2 级高感株系: 这一级别供试株系的病情指数上限为最感病株系的病情指数 B(12.84), 下限为 B-LSD(2.7562)=10.08; 3 级中感株系: 包括所有病情指数介于 4.87 与 10.08 之间的株系。

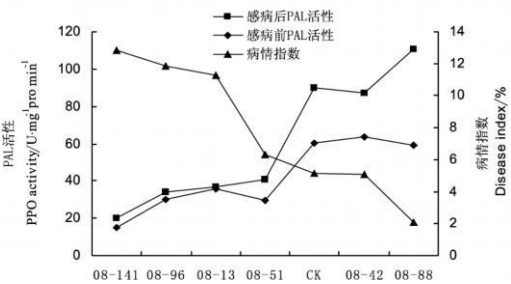


图 2 PAL 活性与抗病性的相关性
Fig. 2 Realtion between PAL activity and resistance

由图 1 看出, 感病前后 PPO 活性与霜霉病病情指数呈极显著负相关, 表明 PPO 活性与葡萄各供试株系对霜霉病抗性呈极显著正相关。感病后, 各供试株系 PPO 活性比感病前都有不同程度的升高, 且病情指数越低, PPO 活性增幅越大; 反之, 病情指数越高, PAL 活性增幅不明显。这与于凤鸣^[4]在研究葡萄抗霜霉病品种 3 项生化指标时证明 PPO 活性在抗、感葡萄品种的健康组织中存在极显著差异的研究结论相同。

表 2 叶片病情指数分级

Table 2 Classification of disease indexes of leaves		
株系	病情指数	感病性分级
Strain	Disease index	Classification of susceptibility
08-141	12.84	3
08-96	11.85	3
08-13	11.28	3
08-51	6.29	2
CK	5.16	2
08-42	5.08	2
08-88	2.11	1

2.4 PAL 活性与抗病性的相关性

由图 2 看出, 感病前后 PAL 活性与霜霉病病情指数呈极显著负相关, 表明 PAL 活性与葡萄各供试株系对霜霉病抗性呈极显著正相关。感病后, 各供试株系 PAL 活性比感病前都有不同程度的升高, 且病情指数越低, PAL 活性增幅越大; 反之, 病情指数越高, PAL 活性

增幅不明显。

表 3 叶片发病率比较			
Table 3 Comparison of disease incidence of leaves			
株系	发病率	LSR 检测(LSR test)	
Strain	Disease incidence	5%	1%
08-141	56. 8	a	A
08-96	55. 1	a	AB
08-13	51. 2	b	B
08-51	27. 4	c	C
08-42	24. 6	cd	C
CK	23. 5	d	C
08-88	10. 6	e	D

2.5 PPO 活性比较

从表 4 可看出, 感染霜霉病后 6 个供试株系除 08-13、08-141 以外, 其它株系叶片中 PPO 活性均存在极显著差异, 且 PPO 活性均比感病前高, 但各株系 PPO 活性增幅差异较大, 08-88 的 PPO 活性最高, 且极显著高于对照。试验说明, 感染霜霉病后, 08-88 叶片中 PPO 活性增幅较大, 防御机制启动迅速。08-13、08-141 感病前后 PPO 活性增幅较小, 差异不显著, 所以霜霉病抗性较小。

表 4 不同自交后代各株系 PPO 活性显著性			
Table 4 The activities of PPO in the leaves of various grape strains in selfing progenies			
株系	染病前 PPO 活性	染病后 PAL 活性	LSR 检测
Strain	PPO activity before infection	PPO activity after infection	(LSR test)
	/ U · mg ⁻¹ · min ⁻¹	/ U · mg ⁻¹ · min ⁻¹	5% 1%
08-88	88. 62	207. 58	a A
CK	79. 26	122. 54	b B
08-42	73. 75	101. 25	c C
08-51	49. 23	96. 13	d D
08-96	50. 314	54. 85	e E
08-13	33. 26	40. 47	f F
08-141	35. 14	38. 91	f F

表 5 不同自交后代各株系 PAL 活性显著性			
Table5 The activities of PAL in the leaves of various grape strains in selfing progenies			
株系	染病前 PAL 活性	染病后 PPO 活性	LSR 检测
Strain	PAL activity before infection	PPO activity after infection	(LSR test)
	/ U · μg ⁻¹ · h ⁻¹	/ U · μg ⁻¹ · h ⁻¹	5% 1%
08-88	59. 1	110. 3	a A
CK	60. 2	89. 7	b B
08-42	63. 6	86. 9	c B
08-51	29. 6	40. 8	d C
08-13	35. 9	36. 6	e D
08-96	29. 9	34. 3	e D
08-141	15. 1	20. 3	f E

2.6 PAL 活性比较

从表 5 可以看出, 各供试株系感染霜霉病后, 08-88 极显著高于其它株系, 且高于对照, 其它株系的 PAL 活性均低于对照, 差异显著。08-13、08-96 的 PAL 活性差异不显著, 与感病前相比增幅不明显, 这表明防御机制启动不明显。

3 讨论

植物的抗病性决定于体内抗病基因的存在和这些

基因表达的速度、程度以及基因表达所产生的抗病物质的量, 不同葡萄品种的抗病性反映了它们的抗病基因存在着差异, 抗病品种在与病原菌相互作用中, 其抗病基因表达的速度快、程度高, 由此导致了植物体内有关的抗病代谢加快, 产生的抗菌物质量大, 植物的抗病性就强。不同葡萄品种感染霜霉菌后 PPO、PAL 活性的变化反映了它们抗病基因表达上的差异, 也正是这种差异导致了它们抗病性的差异。史娟等^[3]研究表明, 葡萄抗病品种叶片感染霜霉病菌后 PPO、PAL 活性比感病品种升高的速度快, 而且幅度大, 表明葡萄品种间的抗性与这 2 种酶活性存在着一定的相关性。该研究表明, 6 个供试株系感病前后 PPO、PAL 活性与霜霉病病情指数呈极显著负相关, 感病后 PPO、PAL 活性比感病前明显升高, 且感病后 6 个供试株系 PPO、PAL 活性升高幅度存在显著差异。由此可见, PPO、PAL 活性与葡萄对霜霉病的抗感特性密切相关, 可利用这 2 种酶的活性作为葡萄抗霜霉病特性鉴定的辅助评价指标, 在生产中在结合田间鉴定明确葡萄品种对霜霉病的抗性。

4 小结

欧美杂种葡萄一般较抗霜霉病, 但品种间存在感病性差异。紫珍香葡萄属于欧美杂交种中较抗霜霉病的品种。该研究采用紫珍香作为亲本进行自交, 在霜霉病发生高峰期对紫珍香自交后代的 6 个株系抗霜霉病特性进行田间调查及对生化指标 PPO、PAL 活性进行鉴定发现, 6 个供试株系对霜霉病的抗性存在较大差异, 其中 08-88 株系抗霜霉病能力显著高于亲本对照, 抗病性最强; 08-42、08-51 的抗病性与亲本对照比差异不明显, 抗病性中等; 08-141、08-96、08-13 抗病性显著低于对照, 抗病性最弱。因此, 高抗株系可以作为抗病育种的抗源亲本加以利用, 如果抗病、丰产、优质结合较好, 还可以因地制宜推广种植。

参考文献

[1] 宋润刚, 张亚凤, 李昌禹, 等. 山葡萄品种(品系)对霜霉病抗性的研究[J]. 北方园艺, 1998, 12(2): 47-49.
[2] 马丽君, 浓尧尧, 陈贵兴. 葡萄霜霉病的防治方法[J]. 果树科学, 1996, 13(1): 70.
[3] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 348-351.
[4] 于凤鸣. 葡萄抗霜霉病品种三项生化指标研究[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1998, 12(2): 68-70.
[5] 史娟, 冯美, 邱艳, 等. 葡萄感染霜霉病菌叶片中一些酶活性变化[J]. 宁夏农学院学报, 2002, 23(1): 17-19.
[6] 曾永三, 王振中. 苯丙氨酸解氨酶在植物抗病反应中的作用[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(3): 56-65.
[7] 李爱贞, 罗宽, 刘毅君. 水稻近等位基因与白叶枯病菌相互作用的生理指标研究[J]. 植物保护学报, 1999, 26(1): 35-39.
[8] Mario M D, Rajgopal S, Frank E W, et al. Rapid activation of phenylpropanoid metabolism in elicitor-treated hybrid poplar (Populus trichocarpa Torr. & Gray × Populus deltoides Marsh.) suspension-cultured cells[J]. Plant Physiology, 1992, 98: 728-737.

黑松针叶提取物抗霉菌活性的研究

孙红英, 卢雪梅, 李 娟, 韩晓弟

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

摘 要: 采用滤纸片法, 检测不同质量浓度的针叶提取物对霉菌的抑制圈大小, 以研究黑松针叶提取物的抗霉菌活性。结果表明: 黑松针叶提取物具有抗霉菌活性, 但抑制效果与其质量浓度不成正比; 3种提取物中, 乙醇提取物的抗霉菌效果最显著, 丙酮和水提取物的抗霉菌效果次之。其对黑曲霉、青霉、根霉起最佳抑制效果的质量浓度分别为 6.25、25.0、12.5 g/L, 其抑菌圈直径分别为 14.8、16.6、12.6 mm。

关键词: 黑松; 提取物; 抗霉菌活性; 抑菌圈

中图分类号: Q 946.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0054-04

近几十年来, 化学农药一直处于快速发展的时期^[1]。目前, 化学农药的种类已增加到 1 300 余种, 全世界化学农药年产量大约在 300~400 万 t^[2]。化学农药广泛应用于农业、林业、果蔬及渔业等领域, 但由于其具有化学性质稳定、残留期长、不易分解等特点, 一旦造成污染, 便很难消除^[3-4], 化学农药的广泛使用必然带来很大的负面影响^[5]; 同时化学农药会杀死天敌, 影响生态平衡, 导致环境自控力下降^[6]; 更让人们担忧的是化学农药可通过生物富集和食物链进入人体和其它生物

体, 最终影响人体健康^[7]。仅 1999 年全国农村农药中毒报告 18 570 例, 死亡 1 311 例, 病死率 7.06%^[8]。

植物是生物活性化合物的天然宝库, 其产生的次生代谢产物超过 403 种^[9]。其中的大多数次生代谢产物如萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体类、独特的氨基酸和糖等均具有杀虫或抗菌活性, 因此植物可以作为天然绿色杀虫抑菌剂的重要资源。以植物为主要原料获取的“植物源农药”因其效率高、毒性低、残留时间短、且符合现代环保意识及人们的健康要求, 而越来越引起世界各国的高度重视^[10]。

迄今为止, 有关植物源杀菌剂方面的研究资料基本空白^[11-13], 而黑松的抗霉菌活性方面的研究更是无人涉足。鉴于此, 该研究力求通过黑松针叶不同提取物的抗霉菌活性的研究, 为开发具有明显杀菌作用的植物源农药提供基础资料, 为植物源农药逐步代替化学农药提供依据, 同时为黑松的药理药化方面的研究提供参考。

第一作者简介: 孙红英(1986-), 女, 本科, 研究方向为植物生物的研究。

通讯作者: 韩晓弟(1963-), 男, 山东莱州市人, 副教授, 理学硕士, 研究方向为植物学。E-mail: hanxiaodi@shou.edu.cn。

收稿日期: 2009-02-20

Evaluation of Resistance to *Plasmopara viticola* and Study on Leaf Biochemical Indexes in Zizhenxiang Grapevine Variety Selfing Progenies

GUO Xiu-wu, ZHANG Na FENG Zhe

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: During the major onset of *Plasmopara viticola*, the resistance of six strains tested from Zizhenxiang grape variety self progenies to *Plasmopara viticola* was studied by means of natural infection investigation in field and determining the PPO and PAL activities in leaves before infection and after infection. The results showed that there was positive correlation between the resistance of grapevines tested and activities of PPO and PAL. The resistance of strains tested existed significantly different. The resistance of 08-88 was the strongest. It improved markedly comparing with the parent strain. The resistance of 08-42, 08-51 was intermediate to *Plasmopara viticola*. The resistance of 08-141, 08-96, 08-13 was the weakest and far beneath the parent strain Zizhenxiang.

Key words: Zizhenxiang grapevine; Self progenies; *Plasmopara viticola*; Resistance evaluation; PPO; PAL