

白粉菌对葡萄叶片生理特性的影响

王伟, 张军科, 王跃进, 杜敬, 张玉洁, 李爽

(西北农林科技大学 园艺学院, 农业部西北园艺植物种质资源与遗传改良重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以欧洲葡萄 F₁ 代株系 15-1-9 为试验材料, 在叶片上接种葡萄白粉菌后, 分别在 0、5、10、15、20、25、30 d 取样, 测定叶片的过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、多酚氧化酶(PPO)活性、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性、可溶性蛋白质含量、丙二醛和木质素含量等生理特性的动态变化, 为葡萄白粉病的防治和葡萄抗白粉病育种提供基础参考资料。结果表明: 葡萄叶片感染白粉菌后, POD、CAT、PAL 的酶活性均高于未接种的健康叶片(CK), 呈上升趋势, 而 PPO 活性则呈下降趋势, 并且在后期略有回升。接种后叶片的可溶性蛋白质含量降低, 丙二醛、木质素的含量有不同程度上升。由此可见, 葡萄白粉菌的侵染对叶片内的生理特性的动态变化有较大影响。

关键词: 白粉菌; 葡萄; 生理特性

中图分类号: S 436.631.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)09-0014-04

葡萄白粉病^[1] (*Uncinula necator* schw. Burr.) 是葡萄的主要病害之一, 易于传播, 并且危害严重, 造成葡萄产区的大面积减产^[2-4]。感染葡萄白粉病不但会削弱树势而且降低葡萄品质, 造成巨大经济损失。现已证实, 受到病原物侵染后, 一些植物体内的过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等酶类会表现特定的功能^[3,8]。植物可溶性蛋白质含量变化与植株抗病性有一定联系^[9]。在病原物侵染过程中, 植物体内也会产生一些次生代谢物质如丙二醛、木质素等, 对病菌侵入起到一定抵抗防御作用^[10,12]。

通过观察, 接种葡萄白粉菌后 0~30 d, 叶片表面发病特征变化最为典型。该试验在接种白粉菌后 30 d 内, 分别在不同时间取样, 研究了葡萄感染白粉病后叶片内的基本生理特性变化, 对研究葡萄白粉菌与寄主之间的互作关系有重要意义, 并为葡萄白粉病的有效防治和抗葡萄白粉病育种提供基础参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为欧洲葡萄 F₁ 代株系 15-1-9, 由西北农林科技大学园艺场葡萄种质资源圃提供。

第一作者简介: 王伟(1983-), 男, 在读硕士, 研究方向为果树生物技术与育种。E-mail: xiye206@163.com。

通讯作者: 张军科(1969-), 男, 甘肃灵台人, 博士, 副教授, 现主要从事果树生物技术与育种研究工作。E-mail: zhangjk@nwsuaf.edu.cn。

基金项目: 国家转基因专项资助项目(JY03-A-19-02); 国家自然科学基金资助项目(30571280)。

收稿日期: 2010-01-26

1.2 试验方法

1.2.1 田间人工接种及取样 2009 年 6 月上、中旬, 参照王跃进^[13] 等方法, 对不同新梢顶端 5~8 节位的叶片进行田间人工接种, 共接种 35 片叶, 对照不接种。试验所用叶片提早套袋隔离, 防止田间杂菌侵染。接种后 0、5、10、15、20、25、30 d 取样, 接种、对照各取 5 片, 采后液氮速冻超低温(-80℃)封存。

1.2.2 测定方法 测定过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚氧化法^[14]; 过氧化氢酶(CAT)测定采用 H₂O₂ 法、多酚氧化酶(PPO)活性测定采用邻苯二酚法^[15]; 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定用 L-苯丙氨酸法; 可溶性蛋白质采用考马斯亮蓝 G-250 染色法; 丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法; 木质素含量测定用硫酸法(Klason 法)^[16]。

2 结果与分析

2.1 接种白粉菌后葡萄叶片内的酶活性动态变化

2.1.1 POD 活性动态变化 如图 1 所示, 葡萄叶片接种白粉菌后 15 d 内, POD 活性明显升高, 在 15~30 d 之间, POD 活性呈缓慢降低趋势。与未接种白粉菌的葡萄叶片对照, 接种后第 10 天叶片内的 POD 活性变化达到最大值, 是未接种叶片的 2.2 倍。葡萄叶片在受到白粉菌的侵染后 30 d 内, POD 活性有明显的动态变化, 变化幅度是未接种的 1.5~2.2 倍。

2.1.2 CAT 活性动态变化 接种葡萄白粉菌后, 叶片内的 CAT 活性变化如图 1 所示, 接种后 10 d 酶活性有升高趋势, 接种后 15~30 d 酶活性开始下降。与未接种的叶片对照, 接种后第 10 天时 CAT 活性变化幅度达到最大, 是未接种叶片的 1.2 倍, 10 d 后开始下降。接种葡

萄白粉菌后 30 d 内,CAT 活性动态变化明显,变化幅度在 0.7~1.2 倍。

2.1.3 PPO 活性动态变化 在葡萄叶片上接种白粉菌后,叶片内的 PPO 活性有一个比较显明的变化趋势,如图 1 所示,与未接种叶片相对照,接种后 10 d 时,PPO 活性降低幅度达到最大,是未接种叶片的 0.5 倍,接种后 10~30 d PPO 活性有缓慢回升,但明显低于对照。总体

而言,当葡萄叶片感染白粉菌后,PPO 的活性有明显降低,降低幅度是未接种的 0.5~0.7 倍。

2.1.4 PAL 活性动态变化 在接种白粉菌后,葡萄叶片内的 PAL 活性有明显的上升趋势,如图 1 所示,与未接种的葡萄叶片对照,接种后 10 d 时 PAL 活性变化幅度达到最大,是未接种的 1.4 倍。接种后 30 d 内,PAL 活性变化幅度是未接种叶片的 1.1~1.4 倍。

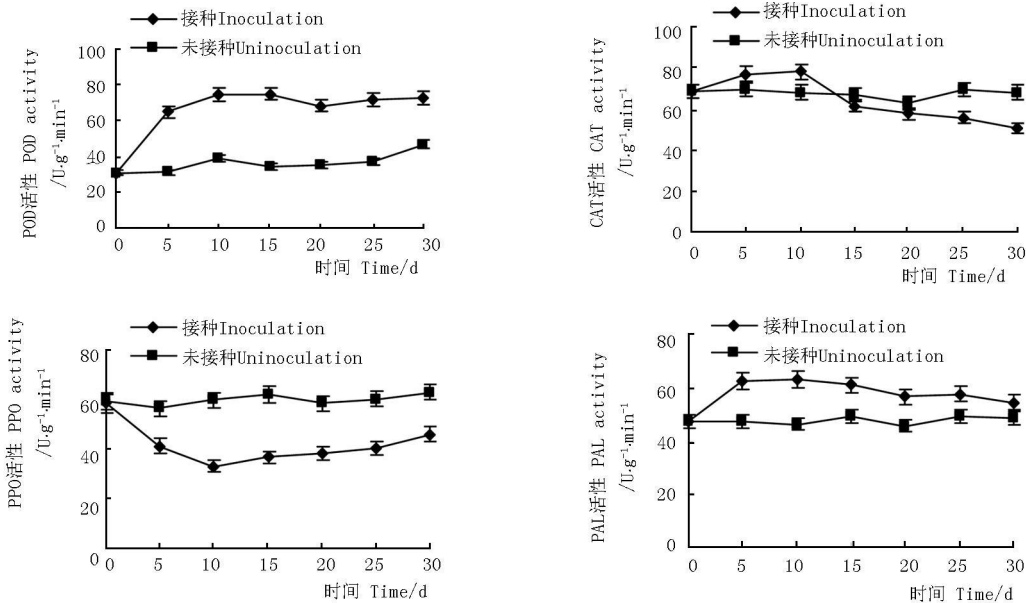


图1 接种白粉菌后葡萄叶片内 POD、CAT、PPO、PAL 活性的变化

Fig.1 Changes of POD, CAT, PPO, PAL activities in grape leaves after inoculation with *uncinula necator*

2.2 接种白粉菌后葡萄叶片内可溶性蛋白质含量变化 葡萄叶片接种白粉菌后,叶片内的可溶性蛋白质含量有显著下降趋势,从图 2 可以看出,与未接种的叶片对照,接种后 30 d 内,在接种葡萄白粉菌后叶片内的可溶性蛋白质含量开始降低,下降幅度是未接种叶片的 0.5~0.8 倍。

2.3.1 叶片内 MDA 含量变化 接种白粉菌后,葡萄叶片内的 MDA 含量呈上升趋势,从图 3 可以看出,与未接种叶片对照,在接种后 25 d 时叶片内的 MDA 含量变化最大,是未接种的 2.4 倍。在接种葡萄白粉菌后 30 d 内,叶片内的 MDA 含量有显著上升趋势,变化幅度是未接种的 1.8~2.5 倍。

2.3.2 叶片内木质素含量变化 接种葡萄白粉菌后,叶片内的木质素含量变化从图 3 可以看出,木质素含量在接种后呈明显上升,与未接种白粉菌的叶片对照,在接种后 20 d 时,叶片内的木质素含量变化达到最大,是未接种叶片的 1.28 倍。接种后 30 d 内,接种叶片木质素含量变化是未接种的 1.1~1.3 倍。

3 结论与讨论

POD 与植物抗病性有关,POD 可与酚类物质相互作用产生醌类物质,醌类物质参与保护植物免受进一步的伤害^[7-19]。杨国顺^[20]等在葡萄黑痘病中认为葡萄叶片中 POD 活性与抗性呈正相关。在接种葡萄白粉菌后,叶片内的 CAT 活性和 POD 活性在变化幅度上不同,在总体变化趋势上都是先升后降,主要原因一是 POD 和 CAT 有协同保护功能;二是可能与葡萄植株对

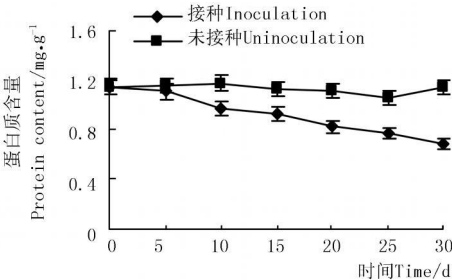


图2 感染白粉菌后葡萄叶片内可溶性蛋白质含量的变化

Fig.2 Changes of protein content in grape leaves after inoculation with *uncinula necator*

2.3 接种白粉菌后葡萄叶片内 MDA、木质素含量变化

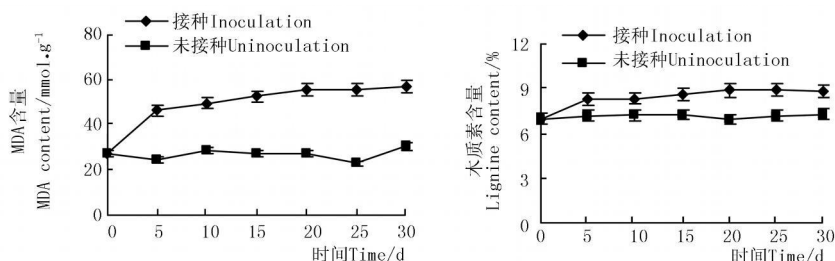


图3 感染白粉菌后葡萄叶片内MDA、木质素含量的变化

Fig. 3 Changes of MDA and Lignine content in grape leaves after inoculation with *uncinula necator*

白粉病的抗性有关,从而表现诱导效应的不同。

PPO 可将酚类物质氧化为醌类物质,对病原菌有毒害作用^[21]。于凤鸣^[22]在葡萄霜霉病研究中认为 PPO 活性在抗、感葡萄品种中存在显著差异。感染葡萄黑痘病后,健康叶片的 PPO 活性比病叶高,并且越是抗病,酶活性增加幅度越大^[23]。PPO 被广泛定位在质体上,细胞碎片梯度离心的分级分离结果表明,富含叶绿素或其它质体色素的部分也富含多酚氧化酶^[24,26]。接种葡萄白粉菌 30 d 后,菌丝体覆盖整个叶片表面,影响光和作用,导致叶绿体的减少。接种后叶片内 PPO 活性明显下降,所得结果与上述研究基本一致。

PAL 是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,苯丙烷类代谢的中间产物可转化为黄酮、木质素等可提高植物的抗性^[27,28]。林海萍、陆胜民等^[29,30]在不同植物材料中研究证实 PAL 促进木质素的生物合成。接种葡萄白粉菌后, PAL 活性变化和木质素含量变化趋势一致,由此可见,在葡萄白粉病的侵入过程中,诱导了 PAL 活性的变化,对抵御白粉菌侵染发挥一定作用。

接种葡萄白粉菌 30 d 内,接种叶片内可溶性蛋白质含量低于健康叶片,可能在病原物侵染过程中产生了毒素等有害物质,使蛋白质的结构破坏或变性。受到病原菌的侵染时,植物有良好抗性,可能会诱导一些相关病程蛋白,都会导致蛋白质含量的变化。对葡萄抗白粉病相关病程蛋白的检测是下一步研究重要内容之一。

葡萄在逆境条件下,因活性氧和自由基的含量增加,促进膜脂过氧化,导致 MDA 含量的增高^[31]。在正常生理状态下,自由基的产生与消除处于平衡状态。葡萄白粉菌的侵染,导致叶片自身的调节能力下降,大量过氧化产物产生,与健康叶片对照,接种叶片内的 MDA 含量明显要高。木质素填充于陆生植物细胞壁纤维素网状结构中,可增强植物细胞和组织抵御逆境的能力^[32]。接种葡萄白粉菌后 30 d 内,接种叶片内木质素含量明显高于健康叶片,表明葡萄白粉菌在侵染过程中诱导了木质素的产生,而木质素的含量变化可能与葡萄对白粉病抗性有一定关系,这需在下一步研究中证实。

参考文献

- [1] 贺普超,王跃进,王国英,等.中国葡萄属野生种抗病性研究[J].中国农业科学,1991,24(3):50-56.
- [2] 李华,张振文.欧亚种葡萄白粉病抗性及其稳定性研究[J].园艺学报,1992,19(1):23-28.
- [3] 徐建华,利容干.黄瓜不同抗性品种感染镰刀菌枯萎病菌后几种酶活性的变化[J].植物病理学报,1995,25(3):239-242.
- [4] Li B J, Li F Y. Changes in activities and electrophoretic patterns of peroxidase and polyphenoloxidase in cucumbers during infection with *Cladosporium cucumerum* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31(1):86-88.
- [5] Miao Z Y, Zhao K H, Liu C Y, et al. Comparison to enzyme activities of PAL, PPO and SOD of resistant and susceptible cultivars to grape white rot [J]. *Journal of Shenyang Agriculture University*, 2003, 34(3):177-180.
- [6] Yun X F, Cui S M. Relationship between activities of enzymes and resistance to *Plasmopara viticola* in cucumber tissues [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1995, 10(1):92-98.
- [7] Jiang Y H. Study of relationship between browning and activities of polyphenol oxidase and peroxidase [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)*, 2003, 29(2):518-522.
- [8] Vaughn K C. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function [J]. *Physical Plant*, 1988, 72:659-665.
- [9] 郑世英.植物抗病的物质代谢基础[J].德州学院学报,2001,17(4):25-28.
- [10] 赵可夫,邹琦,李德全,等.盐分和水分胁迫对盐生和非盐生植物细胞脂质过氧化作用的效应[J].植物学报,1993,35(7):519-525.
- [11] 章霄云,郭安平,贺立卡,等.木质素生物合成及其基因调控的研究进展[J].分子植物育种,2006,4(3):431-437.
- [12] 陈建荣,郭清泉,张学文,等.木质素生物合成调控基因工程研究进展[J].农业生物技术科学,2005,21(7):24-27.
- [13] Wang Y, Liu Y, He P, et al. Evaluation of foliar resistance to *Uncinula Necator* in Chinese wild *Vitis* species [J]. *Vitis*, 1995(3):159-164.
- [14] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000:24.
- [15] 宋士任,王华.葡萄多酚含量和多酚氧化酶活性与组培苗生根关系的初步研究[J].中国农学通报,2005,21(9):70-73.
- [16] 张联科.化工热力学[M].北京:化学工业出版社,1996:61-62.
- [17] Joseph L M, Tan T K, Wong S M, et al. Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial growth of *Pseudocercospora* species [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76(12):2119-2124.
- [18] 蒋选利,李振岐,康振声.过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J].西北农林科技大学学报,2001,29(6):124-129.
- [19] Rathjen A H. Aberrant processing of polyphenol oxidase in variegated grapevine mutant [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99:1619-1625.
- [20] Yang G S, Shi X H, Li B C H, et al. Effect of peroxidase activity and its

isoenzyme of grape leaves on resistance to anthracnose[J] . Deciduous Fruits, 1997(2): 1-4.

[2] Yun X F, Cui S M. Relationship between activities of enzymes and resistance to *Plasmopara viticola* in cucumber tissues [J] . Alta Agriculture Borealis Sinica 1995 10(1): 92-98.

[22] Yu F M. Comparison among three biochemical indexes of grape cultivars anti-infection to down mildew(Bulletin) [J] . Journal of Hebei Agro technical Teachers College 1998, 12(2): 68-70.

[23] 石雪晖,王淑英,吴艳纯 等. 葡萄叶片中单宁、木质素、PPO 活性与抗黑痘病的关系[J] . 中外葡萄与葡萄酒, 1997(4): 8-11.

[24] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* [J] . Plant Physiol, 1949, 24: 1-15.

[25] Henry E N. Sorbitol disrupted spinach(*Spinacia oleracea* L) chloroplasts cytochemical localization of polyphenol oxidase in discontinuous sucrose density gradient fractions [J] . Submicros Cytol, 1981, 13: 365-371.

[26] Shalar T. The tomato 66. 32kD polyphenol oxidase gene: molecular identification and developmental expression [J] . Plant Cell 1992(4): 135-147.

[27] 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.

[28] 郭红莲, 程根武, 陈捷 等. 玉米灰斑病抗性反应中酚类物质代谢作用的研究[J] . 植物病理学报, 2003, 33(4): 343-346.

[29] 席琦芳, 岁自生, 程度 等. 竹笋采后活性氧代谢对木质化的影响 [J] . 中国农业科学, 2001, 34(2): 197-199.

[30] 刘尊英, 姜微波. 常温下 GA3 处理对绿芦笋采后木质化的影响 [J] . 中国农业科学, 2005, 38(2): 383-387.

[31] 张亚冰, 刘崇怀, 潘兴 等. 盐胁迫下不同耐盐性葡萄砧木丙二醛和脯氨酸含量的变化[J] . 河南农业科学, 2006(4): 84-86.

[32] 胡景江, 朱玮, 文建雷. 杨树细胞壁 HRGP 和木质素的诱导积累与其对溃疡病抗性的关系 [J] . 植物病理学报 1999 29(2): 151-156.

Studies on The Leaf Biochemical and Physiological
Changes of Grape Infected by *Uncinula necator*

WANG Wei, ZHANG Jun-ke, WANG Yue-jin, DU Jing, ZHANG Yu-jie, LI Shuang

(College of Horticulture Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Used the material of *Vitis vinifera* F1 individual 15-1-9 and artificial inoculation with *Uncinula necator* in these leaves, after 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 d Sampling, the dynamic change in activities of Peroxidase, Catalase, Polyphenol-oxidase, Phenylalanine Ammonia Lyase, contents of Protein and Malonaldehyde and Lignine content in different periods were studied. After these leaves were infected by *Uncinula necator*, in order to give a base for selecting resistant cultivar and assist to prevent diseases of *Uncinula necator*. The results showed that activities of Peroxidase, Catalase Phenylalanine Ammonia Lyase were stronger than uninoculation(CK) and rise up, activities of Polyphenoloxidase go down to contrast the CK. Later periods had a bit of rise. Protein content was lower than uninoculation. After inoculation content of MDA and Lignine were elevated. So infected by *Uncinula necator* had a larger impact to biochemical and physiological changes in grape leaves.

Key words: *Uncinula necator*; grape; physiological characteristics

知识窗

白菜种子贮藏期限

白菜种子有效贮存期限在 2 a 以内,当年收获的种子当年可直接播种,第 2 a 仍可作种。贮存期超过 2 年的种子,播种后出苗率要降低 20% 左右,且极易感染病害。存放时间越长,出苗率越低,抗病能力就

越差。而且,贮存白菜种子,必须存放在凉爽干燥的地方,切勿用水缸、铁桶等不透气的容器存放,以免把种子捂坏而影响出苗率。光泽鲜亮的为新种子,暗淡的为陈种子。