

植原体浸染对枣树内源激素含量的影响

杜绍华¹, 卜志国¹, 刘洋²

(1. 河北农业大学, 河北 保定 071000; 2. 河北旅游职业技术学院, 河北 承德 067000)

摘要:以枣树组培苗及田间苗为试材, 利用高效液相色谱法分析了感病株与健康株(对照)内源激素含量水平的差异。结果表明:感病植株内源生长素(IAA)含量明显低于健康植株, 内源玉米素(ZT)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)含量有所提高, 且与发病程度呈正相关。同时得出抗病品种较易感病品种健康植株内源游离生长素(IAA)、脱落酸(ABA)含量水平高, 玉米素(ZT)、赤霉素(GA)含量水平低, 该研究有助于从分子角度阐明病原与寄主植物的互作机制。

关键词:枣树; 植原体; 内源激素

中图分类号:S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0012-04

枣是我国重要的特色干果树种, 枣业收入占枣产区农业收入的 30%~50% 以上, 现已成为地方经济的支柱产业。近年来, 随着枣业的大面积发展, 枣疯病持续发展蔓延, 已成为毁灭性病害。仅河北省年直接经济损失就高达数千万至上亿元, 全国则高达数亿元^[1-3]。可见枣疯病已成为我国枣业可持续发展的严重障碍。植原体(Phytoplasma, 原称 Mycoplasma-like organism, 简称 MLO)是引起植物病害的一类重要病原, 长期以来给经济作物造成巨大的危害, 病害的典型症状为丛枝、小叶及矮化直至植株枯死^[4], 其致病机理一直以来是病理研究领域所关注的问题。植物激素是内源产生的代谢产物, 它的含量极低(小于 1 mmol, 经常小于 1 μmol), 活性很强, 对植物的生理过程具有调节作用。植物体内源激素含量的失调就会引起植株生长的异常表现^[5-14]。该研究采用枣树离体培养方法保存枣树植原体, 进一步研究植原体侵染造成枣树体内内源激素的变化, 以期今后更好地阐明 MLO 机理提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为枣树组培苗及田间苗。供试组培苗为组培嫁接枣疯病病源枝, 同未进行嫁接的健株同瓶培养 40 d, 待嫁接株表现枣疯病症状, 进行继代、分化培养, 培养基、温度、光照时间等条件均一致。田间苗为 2 a 生、田间表现健壮生长的西南侧叶片, 采集后随即放入冰壶, 带回实验室后, 用液氮冷冻, 放入 -70℃ 冰箱内存放备用。枣疯病植原体保存在壶瓶枣“大 3”及婆枣

“JL10-1”、“JL10-2”、“JL15”4 个无性系枣树品种上, 以各个品种无病脱毒苗作为健康对照。田间苗以抗病壶瓶枣、抗病婆枣“JL10-1”同易感病壶瓶枣、易感病婆枣“JL15”4 个健康品种进行对照测定(表 1)。

高压液相色谱仪(日本产 HITACHI L-7420 型); HITACHI L-7110 高压泵; 色谱柱 Alltech Allsphere ODS 分析柱(250 mm×4.6 mm ID, 5 μm), HITACHI L-7420 型紫外检测器。

表 1 试验材料代号

Table 1 Experimental materials and codes

代号 Codes	品种 Varieties	代号 Codes	品种 Varieties
1	壶瓶枣“大 3”组培苗	7	婆枣“JL15”组培苗
2	壶瓶枣“大 3”组培苗接种 MLO 病原(F/大 3)	8	婆枣“JL15”组培苗接种 MLO 病原(F/“JL15”)
3	婆枣“JL10-1”组培苗	9	抗病壶瓶枣品种健苗(田间苗)
4	婆枣“JL10-1”组培苗接种 MLO 病原(F/“JL10-1”)	10	易感病壶瓶枣品种健苗(田间苗)
5	婆枣“JL10-2”组培苗	11	抗病婆枣品种“JL10-1”健苗(田间苗)
6	婆枣“JL10-2”组培苗接种 MLO 病原(F/“JL10-2”)	12	易感病婆枣品种“JL15”健苗(田间苗)

1.2 试验方法

1.2.1 内源激素的提取 试验于河北农业大学林学院中心实验室进行。采用 Chen 等^[15]的 HPLC 法提取、纯化、分离, 略加改动进行提取测定。取组培苗及田间苗样品叶片各 0.1 g, 放入 -20℃ 预冷的 100% 色谱甲醇冲洗的预冷研钵内, 加入 -20℃ 预冷 100% 色谱甲醇 10 mL, 冰浴条件下迅速研磨匀浆, 放 4℃ 环境下浸提 48 h, 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于甲醇冲洗过的试管内封口, 0~4℃ 条件下保存。残渣分别加入 10 mL -20℃ 预冷的 100% 色谱甲醇, 4℃ 浸提 48 h, 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液合并于试管。等体积分析纯石油醚(沸程 30~60℃, V:V=1:1)萃取数次, 直至石油醚相无色。各处

第一作者简介:杜绍华(1980-), 女, 河北正定人, 硕士, 实验师, 研究方向为森林保护。E-mail:shaohaudu@163.com.

收稿日期:2013-03-04

理均在弱光下进行,每个样品设3次重复。

1.2.2 内源激素的纯化(HPLC样品的制备) 用30 mL 100%色谱甲醇将SPE固相萃取富集柱活化,加1 mL重蒸水冲洗。将内源激素粗提液加冰乙酸调pH 2.8~3.0,过SPE固相萃取富集柱富集内源激素。然后加2 mL 100%色谱甲醇冲洗叶绿素、酚类以及杂质。充分滤完后,加4 mL乙腈以洗脱富集于SPE固相萃取富集柱上的内源激素。30℃纯N₂条件下使得乙腈充分蒸发,最后用1 mL乙腈溶解内源激素,溶解液过直径0.45 μm滤膜后存放于离心管中,4℃保存备测。试验中选用4种标样分别是生长素(IAA)、玉米素(ZT)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA),并分别建立4种标样的标准曲线。

1.2.3 高效液相色谱 高效液相色谱采用流动相100%色谱甲醇:5%冰乙酸:100%色谱乙腈的体积比为10:9:1。配制前分别用溶剂过滤器。高压泵设为恒流模式,流速为0.8 mL/min,限压为25 MPa,紫外检测仪的检测波长设定为254 nm,温度为室温。采用微量注射器上样,上样量为10 μL。

2 结果与分析

2.1 不同品种病健植株内源生长素(IAA)含量的变化

由图1可以看出,2、4、6、8感病组培苗游离IAA含量水平明显低于健康脱毒苗,降低了0.38~0.43个百分

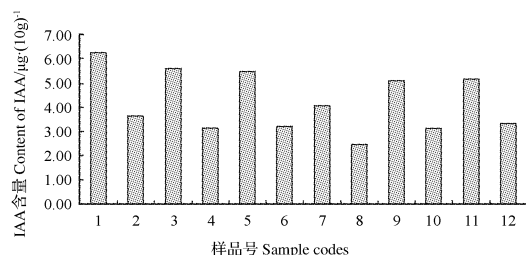


图1 不同品种病健植株内源 IAA 含量

Fig. 1 IAA content in different varieties of susceptible and healthy plants

2.3 不同品种病健植株内源赤霉素(GA)含量的变化

由图3可知,2、4、6、8等感病组培苗的GA含量明显高于1、3、5、7等健康脱毒苗0.29~0.77个百分点,婆枣易感病品种“JL15”GA含量高于抗病品种“JL10-1”、“JL10-2”中GA含量。田间苗采样测定结果也有相似的规律性,壶瓶枣易感病品种、婆枣易感病品种“JL15”内源GA含量水平明显高于抗病品种。

由于合成GA的主要部位是位于顶芽的嫩叶,则可推测由于感病植株小枝丛生而致使GA合成增多、含量提高。而且GA含量水平在不同品种间有着极其明显的差异,婆枣各品种GA含量水平明显高于壶瓶枣。

2.4 不同品种病健植株内源脱落酸(ABA)含量的变化

由图4可以看出,感病植株2、4、6、8品种中ABA含

点。总体看易感病品种“JL15”较抗病品种“JL10-1”、“JL10-2”的IAA含量水平低,平均低了0.26个百分点。而田间苗采样测定结果也表明,壶瓶枣易感病品种(10号)、婆枣易感病品种“JL15”(12号)较抗病品种IAA含量低。由于影响游离IAA含量水平的因素很多,所以,该试验的病健株采取相一致的培养条件、取样时间与部位,尽可能地消除系统误差。由此推断,枣树感染MLO病原后游离IAA含量水平下降,而引起丛枝症状的出现。此结果充分验证了抗病植株的吲哚乙酸酶活性低于感病植株,并随着发病程度的加深,IAA酶活性也相应升高的结论。

2.2 不同品种病健植株内源玉米素(ZT)含量的变化

由图2中可知,2、4、6、8等感病组培苗的ZT含量水平明显高于1、3、5、7等健康脱毒苗,总体来看,婆枣易感病品种“JL15”较抗病品种“JL10-1”、“JL10-2”中ZT含量高。田间苗采样测定结果也表明,壶瓶枣易感病品种、婆枣易感病品种“JL15”ZT含量明显高于抗病品种。同样为了消除误差,病健株采取相一致的培养条件、取样时间与部位。组培苗感病株ZT含量水平较脱毒苗高了0.3~0.7个百分点,易感病品种“JL15”较抗病品种“JL10-1”、“JL10-2”ZT含量平均高0.29个百分点。则可推断,枣树感染MLO病原后ZT含量水平升高。

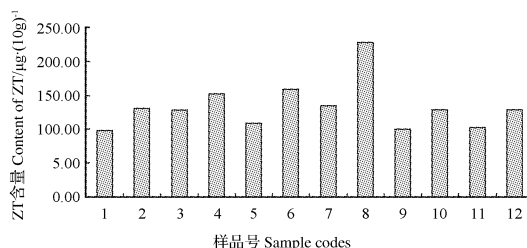


图2 不同品种病健植株内源 ZT 含量

Fig. 2 ZT content in different varieties of susceptible and healthy plants

量水平高于同品系健康品种,而且婆枣易感病品种“JL15”低于抗病品种“JL10-1”、“JL10-2”中ABA含量水平。田间苗同样表明易感病品种比抗病品种ABA含量水平低。在感染MLO后,易感病品种ABA含量水平升高比率要比抗病品种大,且壶瓶枣ABA含量水平总体比婆枣高。

由图4可以看出,病原保存株2、4、6、8等品系中ABA含量水平高于同品系健康对照,而且婆枣易感病品种“JL15”低于抗病品种“JL10-1”、“JL10-2”中ABA含量水平。田间苗同样表明易感病品种比抗病品种ABA含量水平低。在感染MLO后,易感病品种ABA含量水平升高比率要比抗病品种大,且壶瓶枣ABA含量水平总体比婆枣高。

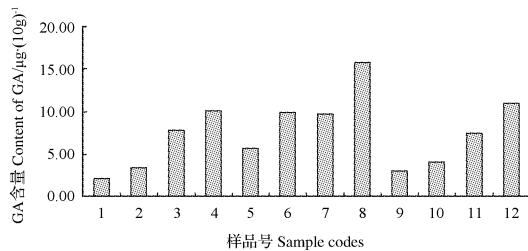


图3 不同品种病健植株内源 GA 含量

Fig. 3 GA content in different varieties of susceptible and healthy plants

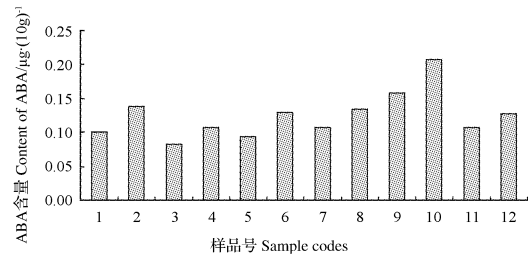


图4 不同品种病健植株内源 ABA 含量

Fig. 4 ABA content in different varieties of susceptible and healthy plants

3 讨论

植物内源激素对植物的生理过程具有调节作用, MLO 引发枣疯病病害的典型症状即丛植、小叶、矮化, 这些症状的出现都与植物的正常生理代谢产生的内源激素含量水平息息相关。国内外很多人提出 MLO 病害症状的发生很可能是由于 C/A 比值的失调造成的。

从该试验结果可以得出, MLO 与枣树互作过程中, 感染 MLO 后的枣树组培苗体内由于吡啶乙酸氧化酶活性的升高, 导致植株内源游离 IAA 含量水平明显低于健康植株(对照)中 IAA 的含量, 从而引起植株节间缩短, 顶端优势被破坏, 促使腋芽萌发, 生根能力下降或丧失, 最后表现为典型的丛枝、小叶、黄化等症状。研究发现, 感染 MLO 的枣树体内内源 ZT 含量水平的升高, 破坏了植株本身的顶端优势, 加速了腋芽的萌生。MLO 病原的侵染引起枣树体内脱落酸含量水平的积累, 往往是植株叶片黄花、停止生长和老化的前兆, 植株体内细胞分裂素含量水平的降低, 以及脱落酸的大量积累, 是导致感病植株生长缓慢、叶片黄花和逐渐矮缩的主要因素。病原的侵染致使植物内源激素含量水平的失调, 从而导致植物生长的一系列变化, 甚至死亡。

MLO 侵染寄主植物后并未直接引起寄主植物的症状表现, 而是在寄主植物的内源激素代谢被改变后并作用一段时间后才逐渐产生的。然而 MLO 病原是如何导致植物内源激素含量水平的失调, 及其同寄主植物的互作因子仍需进一步探讨, 下一步应充分运用分子生物学手段进行研究。

参考文献

[1] 孙朝晖, 温秀军, 孙士学. 枣疯病研究现状[J]. 河北林业科技, 1998

Study on the Change of Endogenous Hormones of Jujube Caused by Phytoplasma Infection

DU Shao-hua¹, BU Zhi-guo¹, LIU Yang²

(1. Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Hebei Tourism Vocational College, Chengde, Hebei 067000)

Abstract: Taking tissue culture seedling and field seedling of *Ziziphus jujube* as materials, the variations of endogenous hormone levels in *Ziziphus jujube* which associated with susceptible and healthy plants were measured using HPLC. The

(2);50-53.

[2] 周俊义, 刘孟军, 侯保林. 枣疯病研究进展[J]. 果树科学, 1998, 15(4):354-359.

[3] 田国忠, 张志善, 李志清, 等. 我国不同地区枣疯病发生动态和主导因子分析[J]. 林业科学, 2002, 38(2):83-91.

[4] Chen T A. Council of Agriculture Plant Protection Series No. 1[C]. Proceedings of Symposium on Plant Virus and Virus-like Disease, 1993: 29-42.

[5] 王丽琴, 唐芳, 赵飞. 苹果紧凑型品种和矮化砧木内源激素的变化[J]. 园艺学报, 2002, 29(1):5-8.

[6] Faust M, Steffens G S. Correlation between internode length and tree size in apple[J]. Acta Hort, 1993, 349:81-84.

[7] Arney S B. The effect of abscisic acid on stem elongation and correlative inhibition[J]. New Phytol, 1969, 68:1001-1015.

[8] Kaminiski W R, Rudnicki. Some growth responses of apple seedlings to abscisic acid and growth stimulators[J]. Biol Plantr, 1971, 13:128-132.

[9] Robitaille H A, Carlson R F. Response of dwarfed apple tree to stem injection of gibberellic and abscisic acids like substances the regulation of apple shoot extension[J]. Amer Soc Hort Sci, 1976, 101(4):388-392.

[10] Kamboj J S. Polar transport of IAA in apical shoot segment of different apple rootstock[J]. Hort Sci, 1997, 72(5):773-780.

[11] Grochowska M J. The dwarfing effect of single application of growth inhibitors to the root-stem connection 'the collar tissue' of five species of fruit trees[J]. Acta Hort, 1997, 72(1):83-91.

[12] 曾襄. 果树生理学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992:108-133.

[13] Yabava U L, Dayton D F. The relation of endogenous abscisic acid to the dwarfing capability of East Malling apple rootstocks[J]. Amer Soc Hort Sci, 1972, 97:701-706.

[14] Tubbs R F. Research fields in the interaction of rootstocks and scions in woody etennials part 2 [J]. Hort Abstract, 1973, 43(6):325-336.

[15] Chen X M, Wang S S. Quantitative analysis of ABA, IAA and NAA in plant tissues by HPLC[J]. Plant Physiol Commun, 1992, 28(5):368-371.

山东平度爱迪尔酒庄主要酿酒葡萄品种的研究

赵竹君¹, 张振文^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 陕西省葡萄与葡萄酒工程中心, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:针对我国葡萄酒产区存在同质化的问题,以山东平度爱迪尔酒庄酿酒葡萄品种“宝石”(‘Cabernet Ruby’)、“梅鹿辄”(‘Merlot’)和“贵人香”(‘Italian Riesling’)为试材,研究了各品种的物候期、病害、成熟进程及成熟果实的主要品质指标,以期发掘该区域内特色优势酿酒葡萄品种。结果表明:“贵人香”和“宝石”的叶片发病率较轻,“梅鹿辄”发病最重,3个品种果粒发病率无明显差异,但“梅鹿辄”的果穗发病率显著高于“宝石”和“贵人香”;供试品种在当地均未达到最佳成熟期,“梅鹿辄”、“宝石”和“贵人香”分别于2012年9月8日、18日和20日采收,采收时“贵人香”的成熟度最好,但果实还原糖含量均低于180 mg/L;“贵人香”果实总酚及单宁含量均极显著($P<0.01$)低于2个红色品种,同时“梅鹿辄”果实单宁含量显著($P<0.05$)低于“宝石”,而“宝石”果实总花色苷极显著($P<0.01$)高于“梅鹿辄”。整体而言,“贵人香”在该地区的表现最佳,具有较好的发展潜力。

关键词:山东平度;酿酒葡萄;病害;成熟进程;果实品质

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0015-04

葡萄品种对葡萄酒质量起着决定性的作用,是酿造优质葡萄酒的基础^[1],不同葡萄品种的浆果品质各不相同,而浆果品质又是影响葡萄酒质量和风格的众多因素(浆果品质、酿造条件、储存条件等)中最主要的一个^[2]。为了获得最佳浆果品质,必须将该品种栽植在最适宜的区域。如法国规定了相应的区域化品种和酒种,甚至适宜的砧木品种,并按区域化方案严格执行,取得了良好的经济效益^[3],一些发展中的葡萄酒产国也越来越重视酿酒葡萄品种的研究^[4]。我国在葡萄品种、酒种的区划方面已经取得了很大进展^[5],但仍然存在非适宜地区种植或者在适宜地区种植非适宜品种的情况,这不仅

影响葡萄酒的质量和生产成本,而且会影响葡萄酒产业可持续发展。因此,针对每个产区的葡萄品种及其果实品质的研究就至关重要^[6]。

胶东半岛是中国酿酒葡萄十大产区之一,特别是沿海地带已成为葡萄种植和葡萄酒企业分布密集的地区^[7]。该区内有烟台、青岛等著名产区,目前对烟台葡萄产区的研究较多,而对其它产区的研究较少。平度市属于青岛产区,该区域的酿酒葡萄产区集中在马戈庄镇阎村,该试验选取阎村主栽酿酒葡萄品种“梅鹿辄”、“宝石”、“贵人香”,通过物候期及病害调查、成熟度监控来对其果实品质进行综合评价和研究,以期平度市酿酒葡萄基地葡萄品种结构优化提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于2012年在山东平度产区马戈庄镇阎村(爱迪尔酒庄)进行,该地区属渤海湾半湿润区,壤质粘土,年活动积温3 800~4 200℃,年平均气温12.5℃,8月平均气温25℃,年平均降水600 mm,无霜期210 d,年日照2 834 h。

第一作者简介:赵竹君(1988-),女,硕士研究生,研究方向为葡萄与葡萄酒。E-mail:fdsmkl@163.com

责任作者:张振文(1960-),男,硕士,教授,博士生导师,现主要从事葡萄与葡萄酒等研究工作。E-mail:zhangzhw60@nwsuaf.cn

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-30-9)。

收稿日期:2013-03-04

results showed that the IAA level of diseased jujube was much lower than that of healthy ones, on the contrary, the ZT, GA, ABA level were much higher than healthy plants, and was positively related with the degree of disease. And at the same time, the IAA, ABA levels of jujube which were easily associated with susceptible were higher than the resistant ones, and the ZT, GA levels on the contrary. The study was helpful to illustrate the mechanism of pathogeny and autoeciousness plants through molecule aspect.

Key words: *Ziziphus jujube*; phytoplasma; endogenous hormone