

疫霉菌侵染后辣椒生理生化指标研究

陈 儒 钢, 刘 珂 珂, 巩 振 辉, 张 莹 丽, 李 大 伟

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:用辣椒疫病菌生理小种 *ph3* 人工接种抗疫病的辣椒品系 A5、A3 和感病品系 EC,并用生理小种 *ph1* 接种抗病品系 A3,接种后分别测定和分析植株体内苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)和几丁质酶(Chitinase)活性的变化。结果表明:接种疫霉菌后,抗病品系与感病品系体内 4 种酶的活性有明显差异,并显示出辣椒品系的抗病性与植株体内的多酚氧化酶活性、苯丙氨酸裂解酶活性、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性呈正相关。

关键词:辣椒;疫霉菌;生理生化指标

中图分类号:S 641.3 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)18-0001-05

辣椒疫病是由辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* L.)引起的一种毁灭性土传病害。该病 1918 年首次在美国发现,现已在世界各地的辣椒种植区发生^[1]。近年来,辣椒疫病在我国许多省、市普遍发生,使辣椒种植受到严重危害,成为我国辣椒生产的严重障碍。目前国内外许多病理学家对辣椒疫病的抗病机制已做了大量的研究,辣椒对疫霉菌的抗性遗传规律相当复杂,多数学者认为其抗性是由多基因控制,其抗病性表达受病原菌株系、接种体数量、寄主生育期、环境条件等因素的影响^[2]。在生理生化指标方面,Alcazar 等对受 *P. capsici* 侵染后的辣椒体内过氧化物酶活性的变化进行了测定,发现在抗病品种中,沿菌丝生长方向的过氧化物酶阻止了菌丝的迅速扩展,植株体内 POD 的活性与病情严重程度有关^[3]。李海燕等研究表明, β -1,3-葡聚糖酶对抗病菌在植物体内扩展起到积极作用,同时发现脯氨酸、丙二醛及可溶性糖的含量在接种后增长速度与积累量是决定辣椒抗病力强弱的关键性生理活性物质^[4-5]。

尽管辣椒疫病的抗性生理生化变化研究很多,但大多侧重于疫病单个生理小种对辣椒各生理指标的影响。植物对病菌的不同生理小种抗性存在差异,不同的抗性

品种,其抗性遗传规律不同,甚至同一抗病品种的不同品系,其抗性遗传规律也不尽相同。因此该试验选用不同抗性品系 A5、A3、EC 受到疫霉菌 *ph3* 侵染后和以及专化抗性品系 A3 受到不同生理小种 *ph1* 和 *ph3* 侵染后,分析植株苯丙氨酸解氨酶、多酚氧化酶、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性的变化情况,探讨其中的变化规律,为了解辣椒对疫病的抗性和抗性机理、以及辣椒抗疫病品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株分别为来自贵州的菌株 P10,属于生理小种 1(*ph1*);来自广东的 ZLT0566(简称 ZLT),属于生理小种 3(*ph3*)^[6]。供试辣椒感病品种 Early Calwonder(简称 EC)、抗病品种 A3 和 A5,由亚洲蔬菜发展中心王添成博士提供,感抗情况见表 1。

表 1 不同材料对辣椒疫霉菌 3 个小种的感抗情况

材料 Varieties	生理小种 Physiological race		
	<i>ph1</i>	<i>ph2</i>	<i>ph3</i>
A3	R	S	S
A5	R	R	R
EC	S	S	S

注:S 是感病;R 是抗病。
Note: Acronym S means “Susceptible”; Acronym R means “Resistible”.

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的准备 孢子悬浮液:将病原菌接到马铃薯(PDA)平面培养基上,在 28℃ 恒温培养箱里暗培养 7 d,然后置于 40 W 日光灯下,培养皿与灯管相距 30~40 cm,诱导孢子囊的产生^[7]。将产生的孢子囊刮到清水中,4℃ 下放置 1 h,再在常温下放置 1 h,孢子囊就释放大量的游动孢子,过滤,收集滤液,用血球计数板计数,然后配制成一定浓度的孢子悬浮液。

第一作者简介:陈儒钢(1978-),男,湖北通山人,博士,讲师,现主要从事蔬菜育种与生物技术的研究工作。E-mail: rugangchen@126.com。
通讯作者:巩振辉(1957-),男,陕西礼泉人,教授,博士生导师,现主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究工作。E-mail: gzh168@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571262);教育部高校博士点基金资助项目(200807120007,20090204120005);西北农林科技大学“青年学术骨干支持计划”资助项目(01140304)。
收稿日期:2010-06-07

1.2.2 接种及采样 待苗子 8 片真叶展平时进行接种, 采用孢子悬浮液法进行接种, 用清水稀释孢子悬浮液, 接种孢子浓度为 10^5 个/mL^[8]。以未接种者作为对照。接种后保湿 24 h, 置于室内, 保持室温在 25~28℃。接种后分别于 0、6、12、24、48、72、96 h 全株混合采样, 液氮速冻后放入超低温冰箱备用。每个时间点采 3 份样品, 3 次重复。

1.2.3 生理指标的测定 苯丙氨酸解氨酶、多酚氧化酶活性的测定参照陈建勋^[9]的方法; β -1,3 葡聚糖酶活性测定参照张穗^[10]的方法。几丁质酶活性测定按以下方法测定: 在 10 mL 离心管中加入 5 mL 0.05 mol/L, pH 5.0 乙酸缓冲液, 称重后备用。用液氮将研钵遇冷后, 取样品液氮研磨加入离心管, 混合均匀, 称重, 2 次重量相减即为材料重量。4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为酶液。取 0.1 mL 酶液加入 0.2 mL 几丁质和 0.2 mL pH 6.4 磷酸缓冲液, 37℃ 水浴 1 h; 取出后 4℃ 下 10 000 r/min 离心 5 min; 取上清 0.2 mL 加入 80 μ L 蜗牛酶和 20 μ L pH 7.8 磷酸缓冲液, 37℃ 水浴 1 h; 加入 100 μ L 硼砂 100℃ 保温 5 min; 再加入 0.6 mL DNS(取

6.3 g DNS 加入 262 mL 2 mol/L NaOH 后共同加入 500 mL 含有 182 g 酒石酸钠的热水溶液中, 再加 5 g 重蒸酚和 5 g 亚硫酸钠, 冷却后定量至 1 000 mL), 100℃ 保温 10 min。冷却至室温测其 540 nm 吸光值。对照加 0.1 mL 煮死酶液, 和其它的一起操作。以每分钟酶液与底物反应产生 1 μ mol 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与分析

2.1 接种后苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化

疫霉菌接种后, 辣椒体内苯丙氨酸解氨酶活性的变化很大。由图 1 可看出, 在未接种对照中, 苯丙氨酸解氨酶的含量是很低的。接种 *ph3* 后, 抗性品种 A5 的 PAL 活性的在 24 h 内持续上升, 24 h 达到峰值, 约为对照的 6.08 倍, 之后下降, 但仍维持较高的水平, 为对照的 3.61 倍。高感品种 EC 接种 *ph3* 后, 2 h PAL 活性就达到了峰值, 为对照的 18.48 倍, 之后总体呈下降趋势, 96 h 恢复到比未接种对照稍低的水平。抗性品种峰值较高, 但出现较晚。

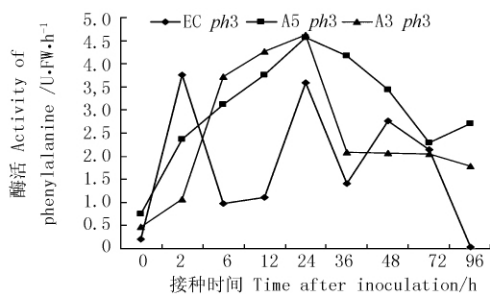


图 1 不同辣椒品种接种疫霉菌后 PAL 活性的变化情况

Fig. 1 The changes of phenylalanine ammonia lyase activity in different varieties after inoculation with *P. capsici*

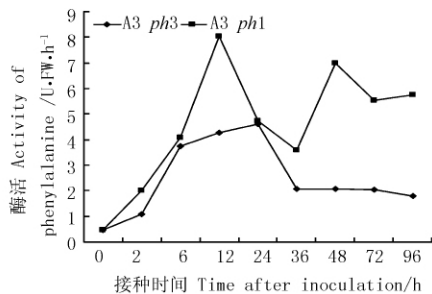


图 2 抗性品种 A3 接种不同小种辣椒疫霉菌后 PAL 活性的变化情况

Fig. 2 The changes of phenylalanine ammonia lyase activity in resistant cv. A3 after inoculation with *P. capsici*

由图 2 可知, 小种专化抗性品种 A3, 在接种不同辣椒疫霉菌生理小种后, PAL 活性都呈先上升后下降的趋势, 接种 *ph3* 后与 A5 趋势相似, 均在 24 h 出现峰值, 为未接种对照的 9.22 倍。最高值大小也与 A5 接近, 但之后迅速下降, 维持在对照 4 倍的水平。接种 *ph1* 后, 在 12 h 达到第 1 次高峰, 为未接种对照的 17.17 倍, 之后下降, 在 48 h 达到第 2 次高峰, 为未接种对照的 14.88 倍。

2.2 疫霉菌对多酚氧化酶(PPO)活性的影响

多酚氧化酶是一类广泛分布于植物体中的一种铜结合酶, 参与生物氧化, 在植物抗病过程中起重要作用。图 3 显示, 抗性辣椒品种 A5 接种疫霉菌 *ph3* 后, PPO 活性在 12 h 略有下降, 为未接种对照的 0.53 倍, 但 36 h 内变化不大, 之后持续上升, 在 96 h 为未接种对照的 3.61 倍。感病品种 EC 在接种病原菌 *ph3* 后 2~48 h 内呈波

浪状较对照升高, 约为对照的 2 倍, 之后恢复到与对照相当的水平。小种专化抗性品系 A3 接种不同的生理小种后(图 4), 在 48 h 以内二者趋势一致, 之后有所区别。亲和组合中, PPO 活性整体呈现先上升后下降的趋势。非亲和组合中, PPO 活性呈持续上升趋势。

2.3 接种后 β -1,3-葡聚糖酶活性的变化

图 5 显示, 不同辣椒品种接种疫霉菌后, β -1,3-葡聚糖酶活性总体都呈上升趋势。感病品种 EC 本身含量很低, 仅为抗病品种 A5 的 1/20, 即使接种后有所上升, 也远远低于抗病品种。抗性辣椒品种 A5 接种疫霉菌 *ph3* 后, β -1,3-葡聚糖酶活性在 2 h 急剧下降, 之后曲线上升, 在 72 h 达到最大峰值, 为未接种对照的 2.52 倍。

图 6 显示, 小种专化抗性品种 A3 在接种不同的小

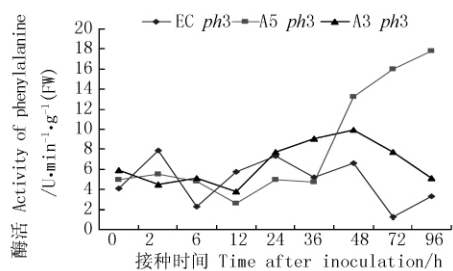


图 3 不同辣椒品种接种疫霉菌后 PPO 活性的变化情况

Fig. 3 The changes of polyphenol oxidase activity in different varieties after inoculation with *P. capsici*

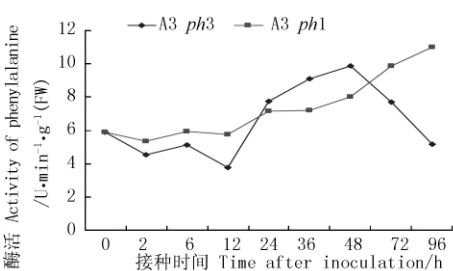


图 4 抗性品种 A3 接种不同小种辣椒疫菌后 PPO 活性的变化情况

Fig. 4 The changes of polyphenol oxidase activity in resistant cv. A3 after inoculation with *P. capsici*

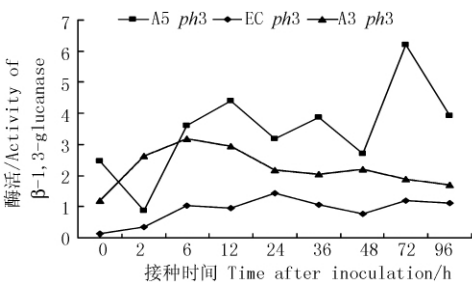


图 5 不同辣椒品种接种疫霉菌后 β-1,3-葡聚糖酶活性的变化情况

Fig. 5 The changes of β-1,3-Glucanase activity in different varieties after inoculation with *P. capsici*

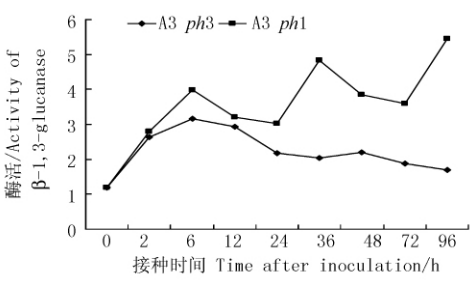


图 6 专化抗性品种 A3 接种不同小种辣椒疫菌后 β-1,3-葡聚糖酶活性的变化情况

Fig. 6 The changes of β-1,3-Glucanase activity in resistant cv. A3 after inoculation with *P. capsici*

种后,亲和组合与非亲和组合在 24 h 以内趋势相同,都是先上升后下降。24 h 之后,非亲和组合中,β-1,3-葡聚糖酶活性曲线上升,96 h 峰值为对照的 4.6 倍。而亲和组合的 β-1,3-葡聚糖酶活性持续下降,96 h 仅为对照的 1.43 倍。

2.4 疫霉菌对几丁质酶活性的影响

图 7 显示,不同辣椒品种接种疫霉菌 *ph3* 后,几丁质酶活性都呈现先上升后下降的趋势,感病品种 EC 在

12 h 出现峰值,而抗病品种 A5 在 48 h 出现峰值。感病品种峰值出现较抗病品种早,但是之后快速下降,而抗病品种的几丁质酶活性一直维持在较高的水平。小种专化抗性品种 A3 接种不同生理小种的疫霉菌后,非亲和组合几丁质酶活性变化与亲和组合趋势一致,都在 2 h 峰值较大,非亲和组合为未接种对照的 2.60 倍,亲和组合稍低(图 8)。

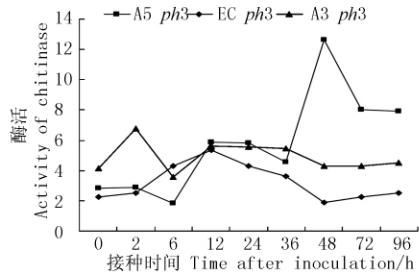


图 7 不同辣椒品种接种疫霉菌后 几丁质酶活性的变化情况

Fig. 7 The changes of chitinase activity in different varieties after inoculation with *P. capsici*

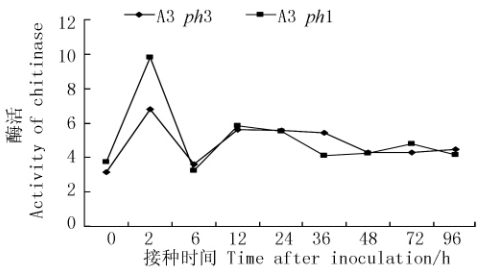


图 8 抗性品种 A3 接种不同小种辣椒疫菌后 几丁质酶活性的变化情况

Fig. 8 The changes of chitinase activity in resistant cv. A3 after inoculation with *P. capsici*

2.5 接种后各酶活的方差分析

疫霉菌接种后对辣椒体内各种保护酶的活性造成

了显著的影响。从表 2、3 可看出,小种专化型品种 A3 在接种不同疫霉菌生理小种 96 h 后,苯丙氨酸解氨酶、

多酚氧化酶、 β -1,3-葡聚糖、几丁质酶的活性变化均达显著水平(表 2);不同的抗感品种接种 *ph3* 后,以上 4 种酶的活性均差异显著,即使是对 *ph3* 同为感病品种,A3 与 EC 的差异也达到显著水平(表 3),表现为在抗病品种中各酶活性较高,随着感病程度的加重,各酶活性逐渐降低,由此可见,以上各酶均可作为辣椒疫病的抗病性指标。

表 2 接种不同生理小种 96 h 后 A3 的酶活性差异

Table 2 The difference activity of A3 after inoculation with different <i>P. capsici</i>				
材料 Cultivar	苯丙氨酸 解氨酶 Phenylalanine ammonia lyase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	葡聚糖 β -1,3- Glucanase activity	几丁质酶 Chitinase
A3 <i>ph1</i>	5.7555a	11.18748a	5.3912 a	4.1387a
A3 <i>ph3</i>	2.0659b	5.15778b	1.41411 b	4.3551b

注:字母 a、b 表示差异显著水平为 5%的各处理间的差异。
Note:a and b Means the significant differences among treatment groups at the 5 percent level.

表 3 接种 96 h 后不同品种间的酶活性差异

Table 3 The difference activity amongdifferent Capsicum cultivars after inoculation				
材料 Cultivar	苯丙氨酸 解氨酶 Phenylalanine ammonia lyase	多酚氧 化酶 Polyphenol oxidase	葡聚糖 β -1,3- Glucanase activity	几丁质酶 Chitinase
A5	2.73441a	17.83780a	3.96562 a	7.84529 a
A3	2.06592b	5.15778b	1.41411 b	4.35507 b
EC	0.03122c	3.30638c	1.11297 c	2.51038 c

注:字母 a、b、c 表示差异显著水平为 5%的各处理间的差异。
Note:a、b and c means the significant differences among treatment groups at the 5 percent level.

3 讨论

植物次生代谢产物,包括酚类、植保素、木质素等可以参与植物防御,而多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶是这些次生物质合成中的关键酶,与植物抗病密切相关。多酚氧化酶能将酚类物质氧化成对病原菌有毒害作用的醌,阻碍病原菌的生长^[10-11]。苯丙氨酸解氨酶催化苯丙氨酸脱氨后产生肉桂酸并最终转化为木质素,因此它是与细胞内木质素生成和沉积有关的防御酶^[12]。很多研究者认为多酚氧化酶活性和苯丙氨酸解氨酶与植物的抗病性成正相关^[13],该研究支持了这一论点,不同抗性的辣椒品种接种后,2 种酶的活性都有所上升,抗病品种的上升幅度大,且能较长时间的维持较高的酶活水平,说明 2 种酶可以作为抗病性的标志。

几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶是植物防御体系中的 2 种防卫因子。有研究表明,几丁质酶可以抑制含有几丁质的真菌的细胞壁的生长^[13]。 β -1,3-葡聚糖酶可以降解卵菌的细胞壁,从而阻止病原菌的入侵,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶对真菌细胞壁的降解具有协同作用,而

且,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶对真菌的抑制作用不是一种简单的累加,而是一种互补的协同增效作用^[14]。该试验表明,感病品种中 β -1,3-葡聚糖酶含量很低,诱导后上升幅度小。辣椒对疫霉菌的抗性同 β -1,3-葡聚糖酶活性呈正相关。小种专化型抗性品种 A3 接种病原菌 *ph1* 后, β -1,3-葡聚糖酶活性曲线上升,而在接种病原菌 *ph3* 后 β -1,3-葡聚糖酶活性持续下降。很有可能在 *ph3* 侵染植株后,破坏了植株的酶合成系统,也有可能是因为该菌侵染迅速,合成的酶被消耗过快,这些,需要与该酶的基因表达相联系。

β -1,3-葡聚糖酶在抗感品种间表现不同,可以作为抗病性的标志。几丁质酶同样受到病原物的诱导,与 β -1,3-葡聚糖酶协同表达,其含量在不同抗性的辣椒品种中差异明显。对辣椒接种疫霉菌后不同保护酶活性的研究,不仅有助于了解它们在植物抵抗病原菌中的作用,也可以作为抗病性鉴定的指标,为辣椒抗疫病种质资源的鉴定选择提供理论依据。

参考文献

[1] 邹学校. 中国辣椒[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
[2] Walker S J,Bosland P W. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper [J]. Journal of American Society for Horticultural Science,1999,124(1):14-18.
[3] Alcazar M D,Espin A. Peroxidase isoenzymes in the defense response of Capsicum to Phytophthora capsici [J]. Physiologia Plantarum,1995,94:736-742.
[4] 李海燕,刘惕芳,甄艳,等. 辣椒品种对疫病的抗性研究—[不同互作中的水解酶活性及其与抗性的关系[J]. 中国农学通报,2005(6):322-325.
[5] 李海燕,刘惕芳,甄艳,等. 辣椒品种对疫病的抗性研究—氨基酸、丙二醛与可溶性糖在抗病中的作用[J]. 中国农学通报,2006,22(11):315-317.
[6] 罗德旭. 辣椒疫霉菌生理小种及其抗性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
[7] 王晓敏. 辣椒疫霉菌孢子诱导技术及辣椒抗疫病的机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006.
[8] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
[9] 陈建勋. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002:30-35.
[10] 张穗,肖培英. 氟铃脲对水稻纹枯病毒的毒力和作用机制[J]. 植物保护学报,2007,34(1):187-90.
[11] 路兴波,吴均趾,周凯南. 小麦抗感纹枯病品种酶活性比较研究[C]//植物保护 21 世纪展望. 暨第三届全国青年植物保护科技工作者学术研讨会论文集. 北京:科学技术出版社,1998:267-269.
[12] 王海河,林奇英,谢联辉,等. 黄瓜花叶病毒三个毒株对烟草细胞内防御酶系统及细胞膜通透性的影响[J]. 植物病理学报,2001,31(1):43-49.
[13] 王利英,侯喜林,刘琳. 甘蓝链格孢菌侵染对白菜保护酶活性和 H₂O₂ 含量的影响[J]. 园艺学报,2008,35(7):1065-1068.
[14] Broekaert W F,van Parijs J,Allen A K,et al. Comparison of some molecular,enzymatic and antifungal properties of chitinase from thorn-apple,tobacco and wheat [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,1988,33:319-331.

不同砧木对黄瓜产量、果霜及抗病性的影响

高彦魁, 李 欣, 赵志军

(河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056000)

摘 要:以河北农业大学蔬菜育种系选育的系列砧木品系为试材,以黑籽南瓜为对照,对嫁接后黄瓜的产量、表皮果霜以及抗病性等进行了研究。结果表明:A2、B1 的早期产量均显著高于黑籽南瓜,其中 A2 的总产量显著高于黑籽南瓜,B1 则与黑籽南瓜相近;A1 的早期产量和总产量与对照差异不显著;B2、B3 则明显不如黑籽南瓜。不同砧木对果实表皮果霜的影响差异显著,B1 在整个结瓜期均不出现霜果,A1 只有少数果实有果霜。参试砧木的抗病能力差异不显著,抗枯萎能力均达到高抗水平。综合评价以 A2、B1 最好,A1 也较优良。

关键词:砧木;黄瓜;产量;果霜;抗病性

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0005-03

黄瓜嫁接栽培不仅能够防治土传病害和克服连作障碍,还能够提高产量和改善品质。目前我国主要使用的砧木是黑籽南瓜,虽然其抗枯萎病、高产,但是,产品表现颜色较深,皮厚,口感差,特别是果实表皮上“果霜”重,严重影响了果实外观品质和口感。为改善黑籽南瓜砧木的不足,该试验利用河北农业大学蔬菜育种系选育的系列砧木品系为试材,以黑籽南瓜为对照,对嫁接后黄瓜的产量和品质以及抗病性进行了研究,以期筛选出优良的黄瓜砧木类型,为黄瓜无公害化栽培,提供优良砧木。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介:高彦魁(1970-),男,硕士,讲师,研究方向是蔬菜育种,现主要从事瓜类和茄果类蔬菜砧木的选育推广和蔬菜嫁接工厂化育苗工作。E-mail:gyk700118@163.com。

收稿日期:2010-06-10

1.1.1 砧木和接穗来源 砧木 A1、A2、B1、B2、B3 由河北农业大学园艺学院育种系提供;黑籽南瓜(CK)购自市场;接穗(黄瓜)品种是目前生产上应用较广的适合于日光温室栽培的“津绿 3 号”,由天津市黄瓜研究所生产。

1.1.2 试验设计 以 A1、A2、B1、B2、B3 为试验砧木,以黑籽南瓜为对照,以津绿 3 号黄瓜为接穗,每个处理定植 2 行,每处理 7.5 m²,20 株,3 次重复,随机排列。

1.1.3 嫁接育苗及定植后的管理 采用穴盘育苗法培育嫁接苗^[9-10]。于 2005 年 1 月 19 日定植于日光温室中。试验地设在河北农业大学标本园内。小高畦地膜覆盖,大小行栽培。畦高 10 cm 左右,大行为 100 cm,小行为 60 cm。温度管理:定植后,白天 25~30℃,夜间 15~18℃,促进缓苗;缓苗后,白天 20~25℃,夜间 8~10℃,防止徒长;结果期,白天 25~32℃,促进光合,降低呼吸消耗。水肥管理:基肥使用 500.25 kg/667m²;共追肥 5 次,总追施尿素 166.75 kg/667m²。

1.2 试验方法

Study on the Physiological and Biochemical Characteristics of Pepper after Inoculation the *Phytophthora capsici*

CHEN Ru-gang, LIU Ke-ke, GONG Zhen-hui, ZHANG Ying-li, LI Da-wei

(Department of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: In order to study the physiological and biochemical characteristics of pepper after inoculation the *Phytophthora capsici*, the changes of activity about phenylalanine ammonia lyase(PAL), polyphenol oxidase(PPO), β -1,3-Glucanase and chitinase were mensurated. The results showed that the changes of these protective enzymes' activities were remarkable difference between different resistance pepper lines. There was a positive correlation between the activities of phenylalanine ammonia lyase(PAL), polyphenol oxidase(PPO), β -1,3-Glucanase and chitinase and the pepper resistance to *Phytophthora capsici*.

Key words: pepper; *Phytophthora capsici*; physiological and biochemical characteristics