

L 型蜡样芽孢杆菌对草莓防御酶活性变化的影响

张 梅, 孙治军, 王鸿磊, 王红艳, 丛慧芳

(中国农业大学 烟台研究院 山东 烟台 264670)

摘 要:以易感白粉病的草莓品种“丰香”为试材,向草莓叶柄注射 L 型蜡样芽孢杆菌,测定了草莓叶片中 SOD、POD、PPO 及 PAL 4 种防御性酶活性的变化及白粉病感染情况。结果表明:注射 L 型蜡样芽孢杆菌后,4 种防御性酶的活性均有不同程度的升高。

关键词: L 型蜡样芽孢杆菌;草莓;防御性酶
中图分类号: S 436.639 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2011)09—0043—03

草莓白粉病是草莓生产中的主要病害,特别是保护地栽培中,草莓白粉病的发生危害日益加重,发生严重时病叶率在 45%以上,病果率在 50%以上,严重影响草莓的产量、品质和效益^[1]。目前,草莓白粉病的防治是以化学防治为主,大量农药的应用,不但影响了草莓的品质,而且对环境也有一定的影响。英国阿伯丁大学的研究表明,L 型细菌在植物体内能够与植物形成内共生关系^[2-3],这种关系可使植物在受到病原体胁迫时,抗病效果大大提高,这些研究为植物病害的防治和抗病植物的育种提供了新的思路。现将 L 型蜡样芽孢杆菌导入草莓体内,研究其防御酶活性变化的规律,以期 L 型

蜡样芽孢杆菌与草莓内共生选育抗白粉病新品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

草莓品种“丰香”;L 型蜡样芽孢杆菌,由中国农业大学烟台研究院微生物实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 L 型蜡样芽孢杆菌导入 采用注射法。将 L 型菌液制成浓度为 1.0×10^7 mL 的悬浮液,注射到草莓叶柄,每个叶柄 0.5 mL,以注射蒸馏水作为对照。分别在接菌前与接菌后 1、3、5、7 d 取样,每个指标测定 3 次,取平均值。

1.2.2 粗酶液提取 参照邹芳斌^[4]的方法。新鲜的草莓叶片 1 g,加 2 mL 提取液(含 5 mmol/L 的巯基乙醇、0.1 mmol/L pH 8.8 的硼酸缓冲液、1 mmol/L EDTA-Na₂),0.1 g 聚乙烯吡咯烷酮。少量石英砂在预冷的

第一作者简介:张梅(1970-),女,副教授,现主要从事植物生理学教学与研究工作。E-mail: hjkx2006@sina.com。
责任作者:孙治军(1956-),男,本科,教授,现主要从事土壤微生物研究工作。
基金项目:烟台市科技攻关资助项目(2006152)。

Study Biology Characteristics of Niangqing Walnut

XIONG Xin-wu¹, LI Jun-nan¹, YANG Zhi-chun², ZHAO Zhi-lin¹, WANG Gao-sheng¹, CHEN Hong-wei¹

(1. Yangbi Walnut Research Station, Yunnan Academy of Forestry, Yangbi Yunnan 672500; 2. Yangbi Yi Nationality Autonomous Counties Forestry Bureau, Yangbi, Yunan 672500)

Abstract: Took 38 a Niangqing Walnut was used as the test material, investigated the pollinated variety and the botanical characteristic. The results showed that the nut was egg round, the single fruit weight was 11.2 g, thick of hull was 1.27 mm. It was easy for taking out of kernel and taking out of whole or part kernel. The kernel weight was 5.7 g, kernel ratio was 50.7%. Fruit was full, color and luster of nut have special light purple or obviously purple arteries and veins. The taste was delicious and sweet, not acerbity, the oil ratio was 74%. It was refined process locality fine specie.
Key words: Walnut; botanical characteristic; pollinated variety; Yangbi

研钵中冰浴研磨成浆, 转入离心管, 再用 2 mL 提取液冲洗研钵及研棒, 然后一并转入离心管 4℃ 下震荡 5 min, 匀浆 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液为酶粗提液。

1.2.3 SOD 活性测定 参照张立军等^[5]方法。取上清液 0.05 mL, 加 3 mL 反应液(含 26 mmol/L 甲硫氨酸, 75 μ mol/L NBT, 2.0 μ mol/L 核黄素, 0.01 mmol/L EDTA, 用 pH 7.8 的磷酸缓冲液配制)。在 25℃、4 000 lx 下照光 20 min 后, 于黑暗下终止反应, 立即在 560 nm 波长处测定吸光值, 以缓冲液代替酶液作为空白。酶活性采用抑制 NBT 光化学反应 50% 为 1 个酶活性单位表示。

1.2.4 POD 活性测定 采用愈创木酚法。取 50 μ L 酶粗提液加入 5 mL 试管中, 与 4.8 mL 含 18 mmol/L 愈创木酚的磷酸缓冲液(0.1 mol/L pH 5.8)混合。于 35℃ 水浴中反应 1 min 后, 加入 150 μ L 2.5%(V/V) H_2O_2 起始酶反应, 记录 470 nm 处的光密度值, 每隔 1 min 记录 1 次, 连续记录 5 min(3 min 内的吸光值变化不超过 1 个吸收单位时, 则酶反应初始速度与加入的酶量呈线性关系)。以不加酶液而加相同体积的提取缓冲液为空白对照。以每分钟 D_{470} 变化 0.1 为 1 个酶活单位 U, 用 $U \cdot g^{-1}$ 表示酶活性。

1.2.5 PPO 活性测定 参照邹芳斌等^[4]的方法, 以 0.02 mol/L 邻苯二酚为底物, 以每分钟内 OD_{398} 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U), 计算酶比活力 $U \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ 。

1.2.6 PAL 活性测定 参照参考文献^[4], 取酶粗提液 0.5 mL, 蒸馏水 4 mL, 和含 0.02 mol/L L-苯丙氨酸的硼酸缓冲液(0.1 mol/L pH 8.8)0.5 mL 混匀, 以不加酶液而加等体积的提取缓冲液为对照, 测定起始 OD_{290} 值。将测定液倒回对应的试管, 在 38℃ 水浴中反应 30 min, 放入冰浴中终止反应, 再次测定 OD_{290} , 计算 2 次 OD_{290} 的差值。以每小时 OD_{290} 变化 0.01 为 1 个酶活力单位 U (相当于每 1 mL 反应混和液中形成 1 μ g 肉桂酸)。

2 结果与分析

2.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

由图 1 可知, 在注射 L 型蜡样芽孢杆菌后 0~7 d 内, SOD 活性产生 2 个活性高峰。注射 L 型蜡样芽孢杆菌后 1 d, SOD 活性明显上升, 出现第 1 个高峰, 随后 SOD 活性降低。在 L 型蜡样芽孢杆菌导入后 5 d, 其活性又迅速上升, 出现第 2 个活性高峰。导入 L 型后 7 d,

其活性下降到与对照接近的水平。

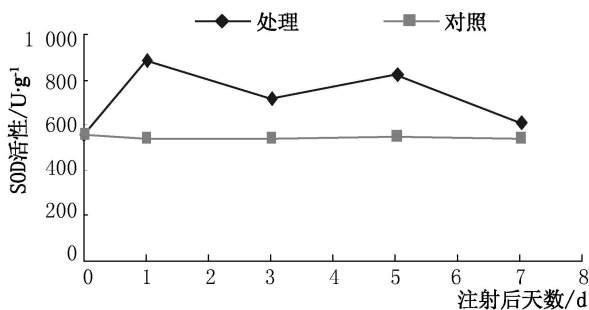


图1 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

2.2 过氧化物酶(POD)活性变化

由图 2 可知, 注射 L 型细胞后 1 d, POD 活性迅速升高, 其峰值是对照的 5.1 倍。之后 POD 的活性迅速下降, 到 7 d 时, 其活性与对照基本持平。

2.3 多酚氧化酶(PPO)活性变化

由图 3 可知, 注射 L 型细胞后, 多酚氧化酶活性变化不明显。接种后 1 d, 多酚氧化酶活性开始缓慢升高, 到 5 d, 其活性达到最高, 但与对照相比, 其最大峰值仅为对照的 1.4 倍, 之后其活性又迅速下降。

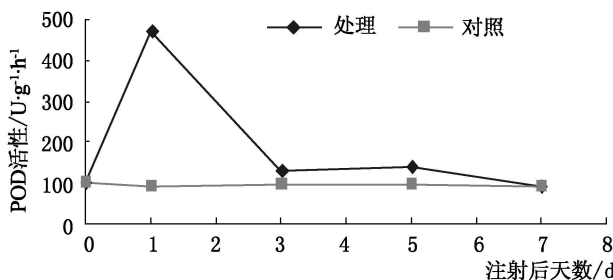


图2 过氧化物酶(POD)活性变化

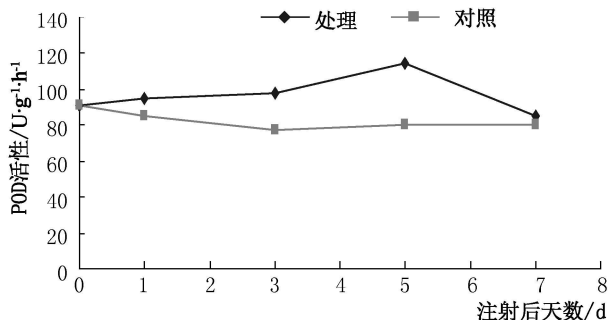


图3 多酚氧化酶(PPO)活性变化

2.4 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化

由图 4 可知, L 型蜡样芽孢杆菌注射到草莓体内后, 草莓体内的 PAL 活性有所提高, 并在 1 d 后出现 1 个活性峰, 其活性为对照的 2.5 倍。3 d 后, PAL 活性开始迅速下降, 甚至比对照组的活性还低。

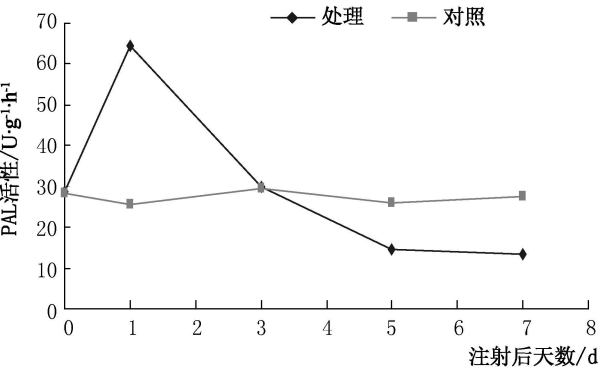


图 4 苯丙氨酸解氨酶 PAL 活性变化

3 讨论与结论

病原菌的侵入可使植物产生许多生理活性物质, 它们参与许多生理代谢过程, 如氧化反应、木质化反应、刺激反应和对病原物毒素的反应等。POD、PPO、SOD 和 PAL 就是这些代谢过程中重要的 4 种酶, 它们可以促进植物体产生多种次生代谢物质, 如木质素、植保素等抗性物质, 以阻止病原菌的侵入和繁殖。该试验向草莓体内注射 L 型蜡样芽孢杆菌, 4 种防御性酶活性在注射 L 型蜡样芽孢杆菌后均有不同程度的提高, 其中 SOD 在

注射 L 型蜡样芽孢杆菌后产生了 2 个活性高峰。注射 L 型蜡样芽孢接菌后这几种防御性酶活性变化与王阿旺等^[7]测定的草莓感染白粉病后的变化规律基本相同, 说明注射 L 型蜡样芽孢杆菌后可以提高草莓抗白粉病的能力, 关于注射 L 型蜡样芽孢杆菌后是否与植株形成共生关系, 还有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 朱秋云, 张健, 胡颖. 草莓白粉病的综合防治技术 [J]. 北方园艺, 2008 (4): 242.

[2] Aloysius S K D, Paton A M. Artificially induced symbiotic associations of L-form bacteria and plants [J]. Division of Agricultural Bacteriology [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1984, 56(3): 465-477.

[3] Jones S, Paton A M. The L-Phase of *Erwinia carotovora* var. *atro-septica* and its Possible Association with Plant Tissue [J]. Susan M. Jones and PATON A. J. appl. Bact, 1973, 36: 729-737.

[4] 邹芳斌, 司龙亭, 李新, 等. 黄瓜枯萎病抗性与防御系统几种酶活性关系的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 181-184.

[5] 张立军, 樊金娟. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 98-101.

[6] 王阿旺, 傅俊范, 周如军, 等. 草莓白粉病菌对寄主防御酶活性的影响 [J]. 江苏农业科学, 2009(2): 111-113.

Effects of L-form of *Bacillus cereus* on Antioxidant Enzyme Activities in ‘Fengxiang’ Strawberry

ZHANG Mei, SUN Zhi-jun, WANG Hong-lei, WANG Hong-yan, CONG Hui-fang
(Yantai Academy of China Agricultural University, Yantai Shandong 264670)

Abstract: L-form of *Bacillus cereus* was inoculated to the leaf petiole of strawberry cultivar ‘Fengxiang’, which was susceptible to the strawberry powdery mildew *Sphaerotheca aphanis* (Wallr.). Antioxidant enzyme activities of SOD, POD, PPO and PAL in the leaves were determined, and the leaf infection of strawberry powdery mildew was investigated. The results showed that the activities of four antioxidant enzymes were increased after inoculating the L-form of *Bacillus cereus* in the strawberry leaves.

Key words: L-form of *Bacillus cereus*; strawberry; antioxidant enzymes