

霜霉病菌侵染对山葡萄“左山一”和“双丰”叶片光系统II活性的影响

王 振 兴, 许 培 磊, 范 书 田, 秦 红 艳, 李 晓 艳, 刘 迎 雪

(中国农业科学院 特产研究所, 吉林 吉林 132109)

摘 要:以“左山一”和“双丰”的1年生扦插苗为试材,利用快速叶绿素荧光诱导动力学曲线分析技术,研究了山葡萄叶片被霜霉病菌侵染后的光系统活性,以深入研究霜霉病对山葡萄影响的生理机理。结果表明:山葡萄叶片感病后,随着时间的延长,相对可变荧光在J点和I点的值 V_j 和 V_i 逐渐上升,电子传递受体侧受到伤害,不同品种间对霜霉病的抗性也存在差异,“左山一”较“双丰”更抗病。

关键词:霜霉病;山葡萄;光系统II;放氧复合体

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0016-04

葡萄霜霉病是由葡萄霜霉病菌[*Plasmopara viticola* (Berk. and. curtis) Berl. and. de. Toni]引起的一种真菌病害,是葡萄生产过程中最主要真菌病害之一,全世界葡萄产区都有发生,同时也是山葡萄主要病害之一,轻者使果园产量降低、品质下降,严重时可导致绝收。葡萄霜霉病主要危害叶片,受害初期产生淡黄色水渍状边缘不清晰的小斑点,以后逐渐扩大为褐色不规则形或多角形病斑,严重影响了叶片的光合作用^[1-2]。

快速叶绿素荧光诱导动力学能够无损测定叶片光合机构的变化,由李鹏民等^[3]建立的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线分析方法-JIP-测定(JIP-test),可以方便、快速、无损地分析逆境胁迫下光系统II(PSII)的功能变化,包括反应中心、放氧复合体和电子传递体 Q_A 、 Q_B 等的变化,现该项技术已广泛应用于植物逆境生理研究中,结果发现生物胁迫^[4-5]和非生物胁迫^[6-10]对植物光合机构的功能造成一定影响。

光合作用为山葡萄生长提供物质基础,葡萄霜霉病导致山葡萄产量降低,其必定与光系统活性受到抑制、光合机构受破坏有密切联系。然而,葡萄霜霉病是如何影响山葡萄叶片光合性能,对光合电子传递链中不同电子传递位点有何影响,对于这些问题国内鲜有研究报道。该研究旨在进一步了解葡萄霜霉病的危害机制,为山葡萄栽培和抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为山葡萄“左山一”和“双丰”的1年生扦插苗,田间条件下培养,常规栽培管理。

1.2 试验方法

试验于2011年在中国农业科学院特产研究所山葡萄种质资源圃避雨大棚内进行,7月20日左右,选取同一节位、叶面积一致的未感病幼叶,置于用无菌水浸透的消毒滤纸大培养皿中,叶背向上,保持温度。每片叶接种30滴(0.02 mL)的孢子囊悬浮液。孢子囊悬浮液的浓度为1 mL含5 000个孢子囊,以无菌蒸馏水为对照。接种24 h后,用真空管吸掉接种液。先在黑暗中培养24 h(25℃),使叶片的被侵部位发病,后置于25℃培养箱中(光照强度 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照14 h/黑暗10 h)继续培养保湿放置1周^[2,11]。

第一作者简介:王振兴(1982-),男,河北邯郸人,硕士,研究实习员,现主要从事植物生理生态等研究工作。E-mail:zhenxinghd@yahoo.com.cn.

责任作者:艾军(1968-),男,吉林磐石人,博士,研究员,现主要从事果树生理生化等研究工作。E-mail:aijun1005@163.com.

基金项目:吉林省科技发展计划资助项目(20100249)。

收稿日期:2014-05-19

were 5.67 roots, 5.33 roots, 1.33 roots respectively, and those of the control were 2.33 roots, 1.67 roots, 1.00 root. In the three soil layer of each treatments, roots with diameter < 2 mm were the most, and roots with diameter 2~5 mm were the least; after applied aquasorb, the soil moisture contents increased.

Keywords: walnut; aquasorb; survival rate; growth

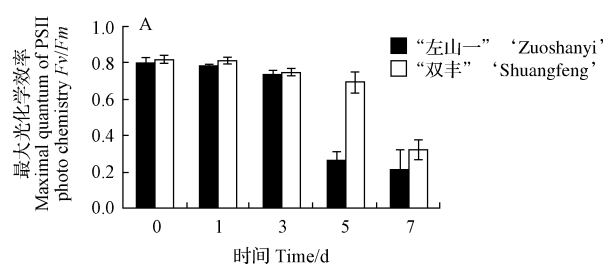
1.3 项目测定

1.3.1 快速荧光动力学曲线的测定 感病处理完成后, 分别在第 0、1、3、5、7 天利用英国 Hansatech 公司生产的植物分析仪 Pocket-PEA 进行快速荧光诱导动力学曲线的测定。测定前先用暗适应夹夹住叶片病斑中心处, 暗适应 15 min, 每处理 6 次重复。

1.3.2 JIP-test 分析 参照 Strasser 等^[12-13]的方法, 利用 F_0 (20 μ s 时荧光, O 相)、 F_K (300 μ s 时荧光, K 相)、 F_J (30 ms 时荧光, J 相) 和 F_m (最大荧光, P 相) 计算 J、I 点的相对可变荧光 $V_i = (F_i - F_0) / (F_m - F_0)$ 。分析单位面积有活性的反应中心的数目 (RS/CS)、单位反应中心吸收的光能 (ABS/RC)、单位反应中心捕获的光能 (TR_0 /RC)、单位反应中心用于电子传递的光能 (ET_0 /RC) 和单位反应中心的热耗散 (DI_0 /RC), 最大光化学效率 (F_v/F_m), 以吸收光能为基础的光化学性能指数 (PI_{ABS}) 以及捕获的激子将电子传递到电子传递链 Q_A^- 下游的电子受体的概率 (ϕ_0) 等参数。

1.4 数据分析

数据统计分析采用 SAS 8.0 分析软件, 采用 Excel



软件作图。

2 结果与分析

2.1 霜霉病对叶片最大光化学效率和以吸收光能为基础光合性能指数的影响

由图 1-A 可以看出, 霜霉病侵染山葡萄叶片后, “双丰”的 $PSII$ 最大光化学效率 F_v/F_m 变化在感病后第 1 天较对照变化不明显, 但在感病 3、5、7 d 后较对照显著降低, “左山一”则随着感病时间的延长在第 5 天和第 7 天显著降低, 分别较对照下降了 59.2% 和 85.3%, 降低幅度远高于“双丰”。

由图 1-B 可以看出, “左山一”叶片以吸收光能为基础的光化学性能指数 (PI_{ABS}) 随侵染时间的延长依次降低了 25.67%、40.94%、98.5%、98.56%, 感病不同时间较对照均呈显著差异, “双丰”叶片的 PI_{ABS} 依次降低了 11.78%、28.74%、45.88%、60.48%, 在感病第 3、5、7 天较对照显著下降, 但“双丰”降低幅度低于“左山一”。

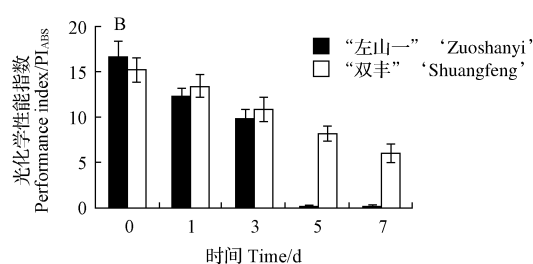


图 1 霜霉病对“左山一”和“双丰”原初最大光化学效率和光化学性能指数的影响

Fig. 1 Effect of downy mildew on maximal quantum of $PSII$ photochemistry (F_v/F_m) and PI_{ABS} of ‘Zuoshanyi’ and ‘Shuangfeng’ leaves

2.2 霜霉病对快速叶绿素荧光诱导动力学曲线的影响

JIP-test 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线用 ($F_m - F_0$) 标准化后得到相对可变荧光 V_i (图 2-A、B), 发现随胁迫时间的延长, “左山一”的动力学曲线的形状较“双丰”发生显著的变化。J 点的相对可变荧光值 (V_J) 和 I 点的相对可变荧光值 (V_I) 随霜霉菌侵染时间的延长总体呈升高的趋势 (图 3-A、B), 但“左山一”较“双丰”变化更显著, “左山一”被感病叶片的 V_J 分别在感病 1、3、5、7 d 较对照增加了 1.9%、13.2%、49.4%、65.6%, “双丰”则较对照增加了 0.008%、18.8%、13.7%、10.1%。“左山一”被感病叶片的 V_I 分别在感病 1、3、5、7 d 对照增加了 2.4%、7.1%、7.3%、9.1%, “双丰”则较对照增加了 2.7%、5.5%、9.7%、8.9%。 V_J 反应的是照光 2 ms 时有活性的反应中心的关闭时间的延长, J 点的荧光上升是由于次级醌受体 (Q_B) 不能及时从初级醌受体 (Q_A^-) 接受电子将其氧化, 造成 Q_A^- 的大量累积的原因。I 点反映了质体醌 (PQ) 库的异质性, 即电子从 Q_A 向 Q_B 传递过程中, 快还原型 PQ 库先被完全还原 (J-I),

随后才是慢还原型 PQ 库的还原 (I-P)^[14-15]。

“左山一”叶片捕获的激子将电子传递到电子传递链 Q_A^- 下游的电子受体的概率 (ϕ_0) 在侵染后第 1 天较对照仅降低了 1.84%, 随着侵染时间的延长, 在感病 3、5、7 d 较对照降低了 12.69%、47.55%、63.13%, “双丰”叶片的 ϕ_0 较对照则降低幅度较小, 分别降低了 0.081%、17.66%、12.88%、9.51%, 均较对照达到了显著差异。

2.3 霜霉病对光系统 II (PS II) 能量分配的影响

霜霉病侵染山葡萄叶片后, O 点荧光 (F_0)、单位反应中心吸收光能 (ABS/RC)、单位反应中心捕获的光能 (TR_0 /RC)、单位反应中心用于电子传递的光能 (ET_0 /RC) 和单位反应中心的热耗散 (DI_0 /RC) 的变化趋势在 2 个品种间表现不一, 在“左山一”上表现为随侵染时间的延长而增加, 而在“双丰”上则没有一致的变化。 F_0 是指经暗适应的光合机构全部 PS II 中心都开放时的荧光强度, 即所有的电子受体 (Q_A 、 Q_B 、PQ 等) 处于最大时间的延长氧化态时的荧光产量。O 点荧光强弱与天线色素

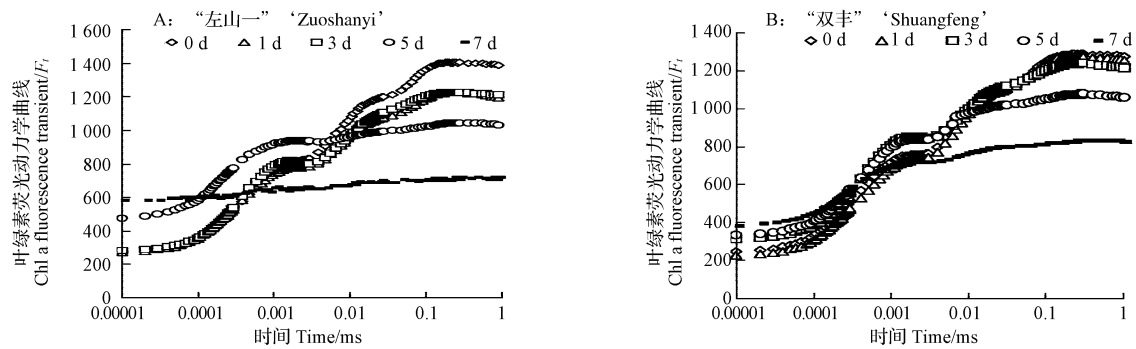


图2 霜霉病侵染对山葡萄叶片相对荧光诱导动力学曲线影响

Fig. 2 Effect of downy mildew on relative variable fluorescence kinetics of leaves

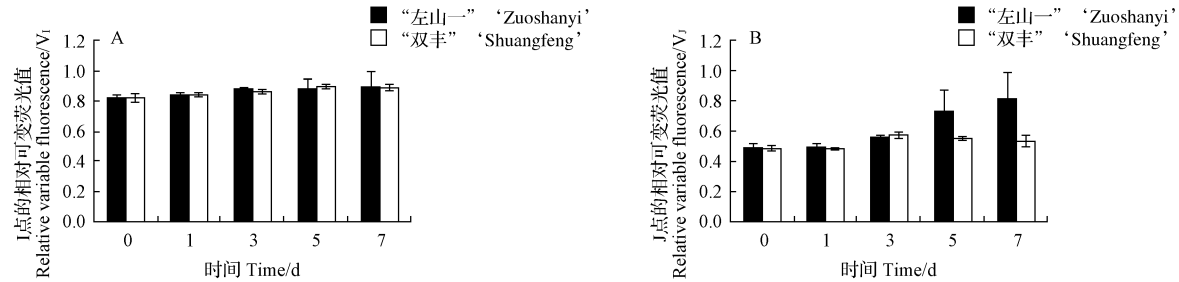


图3 霜霉病侵染对J点和I点的相对可变荧光的影响

Fig. 3 Effect of downy mildew on ratio of relative variable fluorescence (V_j and V_i)

含量的多少及作用中心的活性状态有关。天线色素降解和非光化学能量耗散易造成 F_0 的降低,而光合机构被破坏或可逆失活又使其升高。因此,可以根据 F_0 的变化推断反应中心的状况^[3,16-17]。“左山一”与“双丰”叶片受到霜霉菌侵染后, F_0 呈上升趋势,其中“左山一”叶片随侵染时间的延长较对照依次增加了 1.84%、13.39%、18.18%、132.22%，“双丰”叶片随侵染时间的延长较对照依次增加了 3.54%、35.2%、47.82%、71.96%，均较对照达到了显著差异(表 1)。

由表 1 可以看出,“左山一”叶片的 ABS/RC 、 TR_0/RC 、 ET_0/RC 随着侵染时间的延长而增加,而“双丰”则随着侵染时间的延长较对照呈现先小幅降低而后升高的趋势。其中“左山一”叶片的 ABS/RC 随侵染时间的

延长依次增加了 0.368%、1.18%、129.65%和 409.13%， TR_0/RC 依次增加了 1.66%、0.913%、3.53%、10.55%， ET_0/RC 依次增加了 1.12%、3.51%、5.23%、46.36%， DI_0/RC 依次增加了 6.06%、12.28%、617.29%、1 658.54%，可见“左山一”叶片受到霜霉菌侵染后活性反应中心数量降低,使得单位反应中心被迫接受更多的光能,单位反应中心的性能增加。而“双丰”叶片受到霜霉菌侵染后,由于没有及时形成坏死组织,被侵染的组织仍有一定的光合能力,因此随着侵染时间的延长,这些参数并没有一致的变化。由表 1 还可以看出,霜霉菌侵染同样的时间下各参数增加的幅度表现为 $ABS/RC > TR_0/RC > ET_0/RC$,这可能是由于在电子传递链中由于热耗散增加使光能利用效率降低了。

表 1 霜霉病对“双丰”和“左山一”初始荧光 F_0 以及单位反应中心光能利用率的影响

Table 1 Effect of downy mildew on the minimal fluorescence F_0 and light use efficiency per reaction center of ‘Shuangfeng’ and ‘Zuoshanyi’ leaves

品种 Variety	处理 Treatment	初始荧光参数 F_0	单位反应中心吸收 光能 ABS/RC	单位反应中心捕获的 光能 TR_0/RC	单位反应中心用于电子传递的 光能 ET_0/RC	单位反应中心的 热耗散 DI_0/RC
“双丰” ‘Shuangfeng’	0	226 ± 31 ^c	2.55 ± 0.16 ^b	1.80 ± 0.043 ^a	1.00 ± 0.061 ^a	0.60 ± 0.087 ^{cb}
	1	234 ± 20 ^c	2.48 ± 0.20 ^b	1.82 ± 0.037 ^a	0.99 ± 0.069 ^a	0.55 ± 0.070 ^c
	3	305 ± 25 ^b	2.62 ± 0.23 ^{ba}	1.85 ± 0.42 ^a	0.78 ± 0.049 ^b	0.76 ± 0.12 ^b
	5	334 ± 52 ^b	2.45 ± 0.21 ^b	1.88 ± 0.055 ^a	0.78 ± 0.069 ^b	0.71 ± 0.035 ^{cb}
	7	388 ± 25 ^a	3.04 ± 0.43 ^a	2.04 ± 0.29 ^a	0.95 ± 0.15 ^a	1.00 ± 0.17 ^a
“左山一” ‘Zuoshanyi’	0	254 ± 37 ^c	2.47 ± 0.24 ^c	1.79 ± 0.099 ^a	0.84 ± 0.032 ^b	0.58 ± 0.085 ^c
	1	259 ± 7.6 ^c	2.48 ± 0.045 ^c	1.82 ± 0.016 ^a	0.84 ± 0.023 ^b	0.61 ± 0.014 ^c
	3	288 ± 17.8 ^{cb}	2.50 ± 0.073 ^c	1.81 ± 0.038 ^a	0.86 ± 0.018 ^b	0.65 ± 0.031 ^c
	5	300 ± 10.3 ^b	5.67 ± 0.55 ^b	1.85 ± 0.13 ^a	0.88 ± 0.042 ^b	4.15 ± 0.98 ^b
	7	589 ± 28.6 ^a	12.57 ± 1.31 ^a	1.98 ± 0.28 ^a	1.22 ± 0.36 ^a	10.17 ± 1.45 ^a

3 讨论与结论

生物胁迫下,霜霉病菌对山葡萄叶片侵染后,光合机构对光能的吸收、转换、电子传递都会受到抑制。感病后山葡萄叶片 PI_{ABS} 显著下降,说明霜霉病的侵染导致了 PSII 光化学活性下降; F_0 显著增加说明叶绿素降解加剧导致 PSII 吸收光能减少, V_i 和 V_j 的升高说明电子受体侧受到抑制, ϕ_0 反映了 PSI 是对 PSII 电子传递的综合评价之一,受 PSII 供体侧的电子供应能力和受体侧(包括 PSI)接收电子的能力制约,它的降低间接反映了电子从 PSII 进入 PSI 受到了抑制,这些事实说明,霜霉病菌侵染导致光合电子传递受阻,造成了 PSII 光化学活性下降。

不同品种对霜霉病菌侵染反应是不同的,“左山一”各项荧光参数随侵染时间的延长有较为一致的变化,且变化幅度较大。相对“左山一”而言,“双丰”的各项荧光参数变化幅度较平缓,且随着侵染时间的延长,某些荧光参数(如 ABS/RC 、 ET_0/RC 和 DI_0/RC)呈现异常的变化,这说明“双丰”叶片被霜霉病菌侵染后,并没有在较短时间内形成坏死组织,病菌让可以在侵染部位进一步形成孢子,扩大侵染面积,这些异常变化从侧面说明“双丰”抗病性较“左山一”差。

(该文作者还有赵滢、杨义明、艾军,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] 李晓红,沈育杰,赵淑兰. 山葡萄霜霉病发生规律及综合防治[J]. 特产研究,2002(1):53-55.
- [2] 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(2):47-49.
- [3] 李鹏民,高辉远,Strasser R J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在植物生物学研究中的应用[J]. 植物生理与分子生物学报,2005,31(6):

559-566.

- [4] 部建雯,姚广,高辉远,等. 核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) 侵染抑制黄瓜光合作用的机理[J]. 植物病理学报,2009,39(6):613-621.
- [5] 贾裕娇,高辉远,王维斌,等. 灰霉病菌侵染对黄瓜叶片光合作用和 PSII 光化学活性的影响[J]. 中国科技论文在线,2010,3(7):729-734.
- [6] Van Heerden P D R, Swanepoel J W G, Krüger H J. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub exhibiting C_3 -mode CO_2 assimilation[J]. Environmental and Experiment Botany,2007,61:124-136.
- [7] 姚广,王鑫,高辉远,等. 盐胁迫对高羊茅叶片光系统活性的影响[J]. 中国草地学报,2009,31(2):46-52.
- [8] 李世崇,杜林方. 重金属 Co^{2+} 离子对植物光系统II结构与功能的影响[C]. 中国植物生理学会全国学术年会暨成立 40 周年庆祝大会学术论文摘要汇编,2003.
- [9] 王梅,高志奎,黄瑞虹,等. 茄子光系统II的热胁迫特性[J]. 应用生态学报,2007,18(1):63-68.
- [10] 张子山,张立涛,高辉远,等. 不同光强与低温交叉胁迫下黄瓜 PSI 与 PSII 的光抑制研究[J]. 中国农业科学,2009,42(12):4288-4293.
- [11] 李晓红,沈育杰,葛玉香,等. 山葡萄种质资源对霜霉病感病性的评价研究[J]. 特产研究,1999(2):10-13.
- [12] Strasser R J, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples[M]. UK: Taylor and Francis Press,2000:445-483.
- [13] Strasser R J, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient [M]. Germany: Papageorgiou GC Press,2004:321-362.
- [14] Strasser R J, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient[M]. Netherlands: KAP Press,2004:1-47.
- [15] Li X P, Björkman O, Sih C. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting[J]. Nature,2000,403:391-395.
- [16] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报 1999,16(4):444-448.
- [17] 赵会杰,邹琦,于振文. 叶绿素荧光分析技术及其在植物光合机理研究中的应用[J]. 河南农业大学学报,2000,34(4):248-251.

Effect of Downy Mildew Infection on PSII Photochemical Activity in Leaves of *Vitis amurensis* Rupr. of ‘Zuoshanyi’ and ‘Shuangfeng’

WANG Zhen-xing, XU Pei-lei, FAN Shu-tian, QIN Hong-yan, LI Xiao-yan, LIU Ying-xue, ZHAO Ying, YANG Yi-ming, AI Jun
(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin, Jilin 132109)

Abstract: Taking *Vitis amurensis* Rupr. of ‘Zuoshanyi’ and ‘Shuangfeng’ annual cutting shoots as materials, activities of photosystem(PS) II in leaves under downy mildew infection were studied by simultaneously analyzing chlorophyll a fluorescence transient for lucubrating the physiological mechanism of downy mildew infection effects on amur grape. The results showed that the relative variable fluorescence V_j and V_i increased gradually as downy mildew developed, the acceptor side of PSII was damaged. There were cultivars differences in the response of PSII activity to downy mildew, the photosynthetic apparatus of ‘Zuoshanyi’ cultivar was more resistant to downy mildew than that of ‘Shuangfeng’.

Keywords: downy mildew; *Vitis amurensis* Rupr. (amur grape); photosystem II(PSII); oxygen-evolving complex (OEC)