

白粉病菌侵染苦瓜的生理机制

王国莉

(惠州学院 生命科学系, 广东 惠州 516007)

摘要: 对大顶苦瓜感染白粉病的发病过程和生理机制进行研究。结果发现,感病苦瓜叶片质膜透性与对照相比增加较少,其增加量与病情指数相关性不高;叶绿素 a、b、总叶绿素、类胡萝卜素含量随病情加重均下降,接种 15 d,与对照比分别下降 72.6%、68.5%、71.5% 和 27.1%,其中叶绿素 a、b 和总叶绿素含量变化与病情指数相关性很高,以叶绿素 a 含量变化相关性最高;氧化酶活性测定结果表明,感病苦瓜叶片中 POD 和 PPO 活性与对照比上升,且随感病时间延长活性增加更多,接种 15 d,POD 和 PPO 活性较对照增加 528.5% 和 70.4%,两个酶活性变化与病情指数的相关性也很高。

关键词: 苦瓜;白粉病;病情指数;生理机制;氧化酶活性;POD;PPO

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)02-0242-05

Physiological mechanism in bitter melon infected with powdery mildew fungus

WANG Guo-Li

(Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: The study focused on the pathogenic process of powdery mildew and the physiological mechanism in Dading bitter melon. The result showed that the membrane permeability increased less compared with the control in pathogenic leaf, and its change wasn't obviously related to the pathogenic index. The contents of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid all decreased gradually along with the pathogenic process developed in pathogenic leaf, which decreased by 72.6%, 68.5%, 71.5% and 27.1% respectively compared with their controls after the plant was inoculated for 15 d. Among these changes, the decreases on chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll all presented high relativity to pathogenic index, and the highest relativity was found in chlorophyll a. The test result of oxidases indicated that POD and PPO activities both increased compared with the control in pathogenic leaf, and increased more along with the pathogenic process developed, which could increased by 528.5% and 70.4% respectively compared with their controls after the plant was inoculated for 15 d, and the change on two oxidases activities showed high relativity to pathogenic index.

Key words: bitter melon; powdery mildew; pathogenic index; physiological mechanism; oxidase activity; POD; PPO

白粉病是一种广泛发生的世界性病害。苦瓜 (*Momordica charantia*) 白粉病是由 *Sphaerotheca cucurbitae* 引起的一种潜育期短、再侵染频繁、流行

性强的叶斑病,是苦瓜生产上主要的叶部病害之一,苦瓜每年都因白粉病的发生造成大量减产。有关白粉病感病及抗性的研究在小麦、大麦上开展得较早,

收稿日期: 2006-07-31 修回日期: 2007-12-24

基金项目: 广东省第二批产业技术研究与开发项目(0711120400005); 惠州市科技局科技攻关项目(2003p07); 惠州学院博士科研启动基金(C5 03.02.04)[Supported by Research and Development Foundation for Industrial Technologies of Guangdong Province(0711120400005); Key Technologies Research and Development Program of Huizhou Science and Technology Bureau(2003p07); Initial Scientific Research Foundation to Doctors of Huizhou University(C5 03.02.04)]

作者简介: 王国莉(1974-),女,山西万荣人,汉族,博士,副教授,主要从事植物逆境生理及分子生物学方面的研究。

研究方法和手段都比较成熟、先进,运用了遗传学、细胞学、分子生物学等技术(李丹丹等,2003),因而在抗病品种的选育、应用、信号转导研究等方面取得了重大突破。许多学者都在研究真菌的致病机制和寄主植物的抗病机制,其中许多与植物抗病性有关的酶类如过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)等成为研究的重点方向(阚光锋等,2002)。沈喜等(2003)研究发现被感染的黄瓜叶片叶绿素含量降低,而且 Chl. b 比 Chl. a 敏感,并推测 D1 蛋白的表达量变化是引起电子传递活性波动的主要因素。魏国强等(2004)研究结果则表明黄瓜对白粉病的抗性与植株组织中的 POD、PPO、CAT 活性以及酚类物质含量密切相关,不同抗性黄瓜品种对白粉病的抗性与 PPO 活性、酚类物质含量可能存在一定的正相关。植物病原真菌侵入植物体后可引起寄主植物体内发生复杂的生理生化变化,本研究通过分析苦瓜感染白粉病菌后的一些生理、生化指标变化,重点了解苦瓜感病的生理机制,为抗性鉴定和遗传育种提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

以苦瓜 (*Momordica charantia*) 品种大顶苦瓜作为研究对象。选用无病种子,种植在装有灭菌土的塑料营养钵中,于自然光照培养至 4 叶期,移栽定植于盛有混合土的培养钵,每钵 3 棵,自然光照培养至生长健壮,进行接种。

1.2 白粉病菌的采集

供试白粉病菌采自惠州市汝湖镇苦瓜种植基地。生长中的苦瓜白粉病病株叶片表面有大量真菌孢子,采集病田中布满新孢子堆的病叶,装入塑料袋中密闭保湿,带回实验室。用毛笔将孢子刷到无菌水中制成孢子悬浮液。

1.3 健康植株诱导接种

按常规机械摩擦接种的方法充分接种苦瓜病菌(郝永娟等,2005)。用棉签蘸取孢子悬浮液涂抹到充分湿润的 3~5 叶健康苦瓜叶片上。接种植株用透光性较好的聚乙烯袋罩住,置光线充足、相对湿度在 70%~80% 的地方培养,对照置相同条件隔离培养。试验设 3 个重复,每重复 3~5 株,每株取 3~5 片叶调查。每天观察病情,于接种后 5、10 和 15 d 分别计算病情指数和测定生理指标。

1.4 感病过程统计方法

苦瓜白粉病发病程度以病情指数表示,按方达中(1998)叶的六级法计算病情指数,始病期以一次试验中至少有 2 片叶正面或背面出现 1 个白色小斑点或 1 片叶上至少出现 2 个病斑为标准,按相同方法计算病情指数。

1.5 质膜相对透性的测定

参照李锦树等(1983)的方法进行。取感病苦瓜叶片一片,沿叶脉剪开,用蒸馏水洗净晾干,浸入 10 mL 带盖的试管中,24 h 后用 DDS-11A 型电导仪测其电导(R_1),然后在沸水浴中加热 15 min,冷却至室温后测电导(R_2)。用以下的公式计算相对电导率,来表示质膜的相对透性。质膜透性(%) = $R_1/R_2 \times 100\%$ 。

1.6 光合色素含量的测定

参照邹琦(1995)的方法进行。取 0.3 g 感病苦瓜叶片,以 80% 丙酮在暗中浸提叶片 24 h,用分光光度计在 663、646 及 470 nm 下测定光密度,按 Arnon(1949)方法计算出叶绿素和类胡萝卜素的含量。

1.7 酶活性测定

1.7.1 POD 活性的测定 POD 的抽提:植物材料按 1:10(W/V)加入预冷的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8),冰浴研磨,以 $10\ 000 \times g(4\ ^\circ\text{C})$ 离心 20 min,上清液即为细胞质外体 POD 酶粗提液,用来测定酶活。POD 活性测定:采用愈创木酚法—过氧化物法。参照 Krans 等(1994),每 1 mL 反应液中含 16 mmol 愈创木酚,2.23 mmol 的 H_2O_2 ,以 H_2O_2 启动反应。对照反应液中用磷酸缓冲液代替酶液,30 $^\circ\text{C}$ 下,用分光光度计在波长 470 nm 处测定吸光值的变化。以每分钟每克鲜重中吸光值的变化表示酶的活性。

1.7.2 PPO 活性的测定 PPO 的提取:植物材料按 1:10(W/V)加入预冷的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0),冰浴研磨,以 $10\ 000 \times g(4\ ^\circ\text{C})$ 离心 20 min,上清液用来测定酶活。PPO 活性测定:参照唐茂芝等(1999)和 Kacem 等(1987)的方法改进,3 mL 体系中,0.02 mmol/L 的邻苯二酚 2.9 mL,100 μL 的粗酶液,30 $^\circ\text{C}$ 下,用分光光度计在 416 nm 波长下测定吸光值的变化。以每分钟每克鲜重中吸光值的变化表示酶的活性。

1.8 各生理生化指标与病情指数的相关性分析

将各生理生化指标的各天变化量与当天的病情

指数进行相关性分析,得到相关系数 R_2 ,以“+”表示生理生化指标的变化与病情指数呈正相关关系,指标变化随病情加剧呈上升趋势;“-”表示生理生化指标的变化与病情指数呈负相关关系,指标变化随病情加剧呈下降趋势。

2 结果与分析

2.1 健康植株的诱导感病过程

采用新鲜白粉病菌对健康苦瓜植株叶片诱导接种,由于接种期雨水较多,空气相对湿度比较大,因此接种 2 d 后,植株开始发病,在叶片两面均可产生白色圆形小粉斑,叶背面居多;接种 5 d 后,白粉霉斑向四周迅速蔓延而连接成片,成为边缘不整齐的大片白粉病斑,上面布满白色粉状物;接种 10 d 后,叶片逐渐变黄萎蔫;接种 15 d,病情继续发展,病叶变黄干枯,白色粉状物的颜色也渐变为灰白、灰褐色,病叶、病斑生成许多黄褐色至黑色小点。从整个

发病过程来看,发病初期,苦瓜诱导接种的 3~5 片叶首先感染白粉病,出现病斑,然后逐渐向上蔓延,接种 15 d 后就可以蔓延至 10 片叶以上,甚至布满整株,植株进入发病高潮期。分别对接种 5 d、10 d 和 15 d 的苦瓜植株进行病情统计,得到病情指数分别为 17.6%、28.8%和 43.3%。

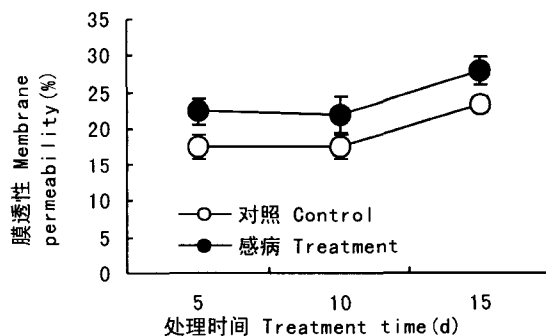


图 1 不同感病时间苦瓜植株质膜透性的变化
Fig. 1 Changes of membrane permeability after different treatment times in bitter melon

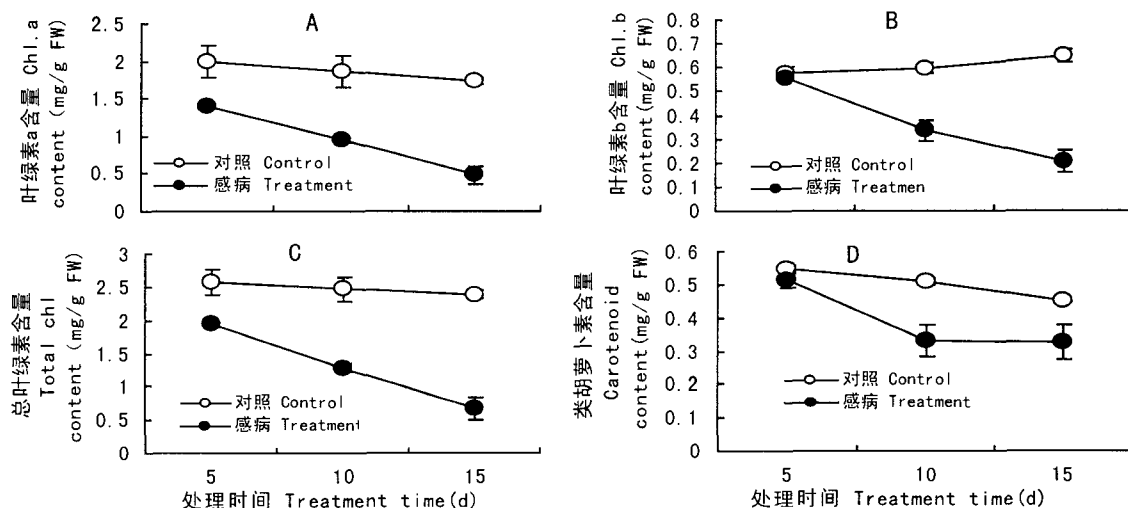


图 2 不同感病时间苦瓜植株叶绿素 a(A)、叶绿素 b(B)、总叶绿素(C)和类胡萝卜素(D)含量的变化
Fig. 2 Changes of contents of Chl. a(A), Chl. b(B), total chlorophyll(C), carotenoid(D) after different treatment times in bitter melon

2.2 质膜透性的变化

经诱导接种,感染白粉病的苦瓜叶片中,质膜透性与对照比略有增加,接种 5 d、10 d 和 15 d 后,与对照相比分别增加 27.7%、24.6%和 19.9%(图 1)。说明在苦瓜叶片发病过程中,质膜透性的变化并不能完全反映植株的受伤害程度。

2.3 感病植株色素含量变化及与抗病性的关系

通过分析测定,苦瓜感染白粉病后,植株体内叶绿素 a、b、总叶绿素和类胡萝卜素含量与对照比均

下降,且随感病时间延长下降加剧。与对照比,接种 5 d、10 和 15 d 后,叶绿素 a 含量分别下降 29.9%、49.4%和 72.6%(图 2:A);叶绿素 b 含量分别下降 3.7%、44.1%和 68.5%(图 2:B);总叶绿素含量分别下降 24.0%、48.1%和 71.5%(图 2:C);类胡萝卜素含量分别下降 6.4%、34.8%、27.1%(图 2:D)。

2.4 感病植株氧化酶活性变化及与抗病性的关系

对氧化酶活性测定的结果表明,苦瓜感染白粉病后,植株体内 POD 和 PPO 活性与对照比增加,且

随感病时间延长,酶活性增加愈多。与对照比,接种 5 d、10 d 和 15 d 后,感病苦瓜植株体内 PPO 活性分别增加 35.1%、52.4% 和 70.4% (图 3:A)。POD 活性变化与 PPO 相同,POD 活性在苦瓜对照和感病植株中的活性很高,感病后活性增加也很快,接种 5 d、10 d 和 15 d 后,感病植株体内 POD 活性分别比对照增加 234.2%、373.9% 和 528.5% (图 3:B)。

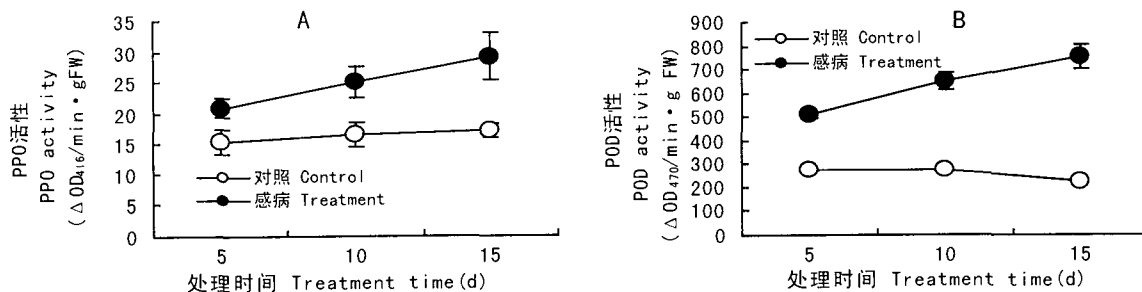


图 3 不同感病时间苦瓜植株 POD 活性(A)和 PPO 活性(B)的变化

Fig. 3 Changes of POD(A) and PPO(B) activity after different treatment times in bitter melon

表 1 感病苦瓜植株各生理生化指标与病情指数的相关性分析 ($n \geq 5$)

Table 1 The analysis of relativities between different physiological and biochemical index and pathogenic index in bitter melon after being inoculated

生理生化指标 Physiological and biochemical index	质膜透性 Membrane permeability	叶绿素 a Chl. a	叶绿素 b Chl. b	总叶绿素 Total Chl.	类胡萝卜素 Carotenoid	PPO 活性 PPO activity	POD 活性 POD activity
相关性 Relativities(R_2)	+0.1063	-0.9965	-0.9749	-0.9904	-0.3003	+0.9968	+0.998

POD 活性的变化与病情指数的相关性最高。

3 结论与讨论

植物在遭遇各种逆境时,质膜完整与否是衡量其抗性的一个重要生理指标,一般都会表现为质膜透性增大。本研究发现,苦瓜感染白粉病菌后,植株质膜透性与对照比增幅不大,没有随感病时间增加而逐渐增大(图 1),与病情指数的相关性也不高(表 1),因此这一指标的变化不足以反映苦瓜感病后的受伤害程度。叶绿素是光合作用反应的主要色素,有关叶绿素与植物抗病性的关系,在不同植物与病原菌的相互作用中表现不同。刘会宁等(2001)报道了几个欧亚种葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定,不同抗性品种的叶绿素含量与其相应的病情指数呈显著正相关。而李淑菊等(1997)对黄瓜黑星病抗性不同材料叶绿素含量的测定结果表明,叶绿素含量与抗病性无明显关系。对不同抗感病性苜蓿品种感染白粉病后叶绿素含量的变化进行研究的结果表明,感

2.5 相关性分析结果

表 1 中,色素含量的变化与病情指数呈负相关,质膜相对透性和两种氧化酶活性的变化与病情指数呈正相关,但质膜相对透性和类胡萝卜素含量变化与病情指数的相关性不高,叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、PPO 活性、POD 活性的变化与病情指数的相关性较高,都可以达到 97% 以上,其中叶绿素 a 和

病前各品种叶绿素含量差异不大,接白粉菌后,各品种的叶绿素含量均有所下降,感病品种下降幅度明显大于抗病品种,而且其叶绿素含量随发病程度的增加显著降低,叶绿素含量与病情指数呈显著正相关(徐秉良等,2005)。本研究发现,苦瓜感染白粉病后,植株体内叶绿素和类胡萝卜素含量均下降,并随发病程度增加下降加剧(图 2)。将各色素含量变化量与相应的病情指数进行相关性分析(表 1),发现叶绿素 a、b 和总叶绿素含量的下降量与病情指数相关性都比较高,相关性最高是叶绿素 a(图 2:A),其次是总叶绿素(图 2:C)和叶绿素 b(图 2:B),类胡萝卜素含量下降量与病情指数相关性不高(图 2:D)。这一研究结果为今后抗病育种中抗病品种选育提供了依据。

植物抗病的本质一直是国内外学者普遍关注的问题。植物的保护反应是复杂的新陈代谢的结果,其生理反应是通过酶催化活动来实现的。其中许多与植物抗病性有关的酶类如 POD、PPO、CAT 等成为研究的重点方向(阚光锋等,2002)。林敏敏等

(2007)研究发现银杏叶片接种疫霉菌后,POD与PAL的变化与抗病性呈正相关,而PPO的活性与抗病性不相关。

魏国强等(2004)的研究结果表明,黄瓜对白粉病的抗性与植株组织中的POD、PPO、CAT活性以及酚类物质含量密切相关,不同抗性黄瓜品种对白粉病的抗性与PPO活性、酚类物质含量可能存在一定的正相关。牛立元等(2004)的工作确定了小麦叶片SOD、POD活性与白粉病的抗性关系。屈红霞等(2000)研究发现,菠萝采后黑心病的发生与PPO活性升高有明显关系。本研究中,苦瓜接种前后植株中POD活性都很高,感病后,POD活性急剧增加,并随时间延长增加愈多,15 d后可比对照增加528.5%(图3:B),酶活性增加量与病情指数相关性也很高,相关系数达0.998(表1)。这表明苦瓜感病后POD活性的增加可以作为抗病育种中衡量抗性的有效生理指标之一,指导育种。对PPO活性的分析结果表明,PPO在苦瓜接种前后植株中活性不是很高,感病后活性增加,且随时间延长增加加剧,但没有POD活性增加剧烈。接种15 d后可比对照增加70.4%(图3:A),酶活性增加与病情指数相关性高,相关系数达0.9968(表1)。因此,通过分析苦瓜感病后PPO活性的变化,一定程度上可以反映苦瓜的抗病性强弱,这与林敏敏等(2007)的研究结果不同。

参考文献:

- 方中达. 1998. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社:367-379
- 邹琦. 1995. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社:32-35
- Arnon D I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Betavulgaris*[J]. *Plant Physiol*, **24**:1-15
- Hao YJ(郝永娟), Wang WL(王万立), Liu CY(刘春艳), et al. 2005. Improvement on bioassay methods of *Sphaerotheca fuliginea*(黄瓜白粉病生测技术的改进)[J]. *Tianjin Agric Sci*(天津农业科学), **11**(3):37-40
- Kacem B, Cornet J A, Marshall M R, et al. 1987. Nonenzymatic browning in aseptically package drinks: effect of ascorbic acid, amino acid and oxygen[J]. *J Food Sci*, **52**:1 668-1 672
- Kan GF(阚光锋), Zhang GM(张广民), Fang BH(房保海), et al. 2002. The effects of *Pseudomonas syringae* PV. *Tubaci* on the defendant in tobacco cells(烟草野火病菌对烟草细胞内5种防御酶系统的影响)[J]. *J Shandong Agric Univ(Nat Sci)*(山东农业大学学报·自然科学版), **33**(1):28-31
- Krans T E, Fletcher R A. 1994. Paclbutrazol protect wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? [J]. *Plant Cell Physiol*, **35**(1):45-52
- Li DD(李丹丹), Wang HG(王洪刚), Liu SB(刘树兵), et al. 2003. Cytological identification and RAPD analysis of *Tritelytrigia* alien disomic substitution line with powdery mildew resistance(抗白粉病小偃麦异代换系的细胞学鉴定和RAPD分析)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **29**(4):525-529
- Li JS(李锦树), Wang HC(王洪春), Wang WY(王文英), et al. 1983. Effect of drought on the permeability and membrane lipid composition from maize leaves(干旱对玉米透性和膜脂的影响)[J]. *Acta Photophysiol Sin*(植物生理学报), **9**(3):223-228
- Li SJ(李淑菊), Lv SZ(吕淑珍), Ma DH(马德华), et al. 1997. Studies on mechanism of disease resistance of cucumber to scab (*Cladosporium cucumerium*)(黄瓜对黑星病的抗性机理)[J]. *Acta Agric Boreali Sin*(华北农学报), **12**(2):121-124
- Lin MM(林敏敏), Liao YM(廖咏梅), Zhou ZQ(周志权). 2007. Study on relationship between resistance against *Phytophthora micotianae* and variation of three enzymes activities of *Gindgo biloba*(银杏叶片三种酶活性变化与抗疫霉菌关系的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(3):513-517
- Liu HN(刘会宁), Zhu JQ(朱建强), Wan YX(万幼新). 2001. Evaluation of resistance to *Plasmopara viticola* for some Asian and European grape(*Vitis viniifera*) varieties(几个欧亚种葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定)[J]. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报), **17**(3):64-67
- Niu LY(牛立元), Wang HS(王鸿升), Shi MW(石明旺), et al. 2004. Changes of SOD and POD activities in wheat leaves infected by wheat powderymildew and their relations to resistance(小麦叶片SOD、POD活性与白粉病抗性关系)[J]. *Henan Inst Sci Tech*(河南职业技术学院学报), **32**(4):5-8
- Qu HX(屈红霞), Tang YL(唐友林), Tan XJ(谭兴杰), et al. 2000. Effects of low temperature and waxing on the control of post harvest pineapple blackheart(低温打蜡对贮藏菠萝黑心病控制的作用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **20**(1):83-87
- Shen X(沈喜), Li HY(李红玉), Wen Y(文雅), et al. 2003. Influence of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) infection on photosynthetic electron transport and protein D1 expression of cucumber(*Cucumis sativus*) leaf(白粉病菌侵染对黄瓜叶片光合电子传递及PS II功能蛋白D1表达的影响)[J]. *Acta Pathol Sin*(植物病理学报), **33**(6):546-549
- Tang MZ(唐茂芝), Bei F(贝锋), Zhou SY(周升扬). 1999. 出口板栗加工中的褐变因素及其控制[J]. *Sci Tech Food Indu*(食品工业科技), **20**(5):11-13
- Wei GQ(魏国强), Qian QQ(钱琼秋), Zhu ZJ(朱祝军). 2004. Investigation on resistance of cucumber against powdery mildew and its physiological mechanism(黄瓜白粉病抗性及其生理机制的研究)[J]. *Acta Agric Boreali Sin*(华北农学报), **19**(2):84-86
- Xu BL(徐秉良), Li MQ(李敏权), Yu JH(郁继华), et al. 2005. The relation between the contents of chlorophyll in alfalfa varieties and the resistance to powder mildew of alfalfa(苜蓿对白粉病的抗性与叶绿素含量的关系)[J]. *Prat Sci*(草业科学), **22**(4):72-74