

文章编号: 1009-038X(2000)06-0565-05

酶活性变化在萝卜抗 TuMV 分析鉴定中的应用

李 烨

(淮阴师范学院生物系, 江苏淮阴 223001)

摘 要: 不同萝卜品种接种抗感芜菁花叶病毒(TuMV)后, 测定不同时期叶片中的过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸裂解酶(PAL)的活性. 结果表明, 抗病品种 POD 活性的略低于感病品种, 接种后 POD 活性升高; 抗病品种 PPO 活性比感病品种高, 接种后抗病品种 PPO 活性迅速升高, 与抗性呈正相关, 可以作为抗性大小的衡量指标; 抗病品种 PAL 活性比感病品种高, 接种后变化无规律.

关键词: 萝卜; 芜菁花叶病毒; 抗性; 酶

中图分类号: Q55

文献标识码: A

Analysis and Identification of Radish Resistance to TuMV According to the Changes of Enzymes Activity

LI Ye

(Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huaiyin 223001)

Abstract: The activity of three enzymes in radish leaves resistant or susceptible to TuMV after inoculation was measured. The result showed that POD activity of varieties resistant to TuMV is lower than varieties susceptible to TuMV and increases after inoculation. PPO activity of varieties resistant to TuMV is higher than varieties susceptible to TuMV. PPO activity in leaves is positively related to the resistant to TuMV and can be used to scale the TuMV resistance. PAL activity of varieties resistant to TuMV is higher than varieties susceptible to TuMV. The changes of PAL have not pattern.

Key words: radish; TuMV; disease resistance; enzyme

病毒病是危害萝卜的重要病害之一, 不但影响产量, 而且影响萝卜的品质, 每年萝卜因病毒病减产 20%~30%. 从李德保^[1]、韩素中^[2]等人的研究中可以发现, 危害萝卜的主要毒源是芜菁花叶病毒(*Turnip Mosaic Virus*, TuMV), TuMV 为 RNA 病毒, 属马铃薯 Y 病毒组一个成员, 广泛分布于世界各地. 它引起十字花科作物花叶严重畸形. 世界上许多学者对该病毒进行了深入研究.

20 世纪 60 年代以来, 人们对酶活性变化与植物抗病性的关系进行了大量研究, 但不同学者在不同材料上得出许多不一致的结果, 甚至相互矛盾的报道. 作者通过对 6 份材料接种 TuMV 后不同天数叶片内 POD、PPO、PAL 酶活性变化的研究, 探讨酶活性变化与抗病性的关系, 找出各种酶活性与 TuMV 抗性的关系, 并通过苗期萝卜品种的酶活性为萝卜抗 TuMV 的苗期鉴定提供理论依据.

收稿日期: 2000-09-11; 修订日期: 2000-10-28.

作者简介: 李烨(1964-), 女, 江苏淮阴人, 理学学士讲师.

1 材料与方法

1.1 供试品种

供试萝卜 3 种抗性品种分别为秋魁青、四季红一号和热白萝卜, 3 种感病品种分别为南研 30 天、杨花萝卜、夏长白萝卜; 依次编号为 R_1 、 R_2 、 R_3 及 S_1 、 S_2 、 S_3 。

1.2 接种

病毒来源于江苏省农科院, 在短叶十三上繁殖保存。TuMV 提取液含有 1% 的 K_2HPO_4 和 0.1% 的 Na_2SO_3 。取病叶约 1 g, 加入 1.5 mL 缓冲液, 研磨成匀浆, 纱布过滤, 采用金刚砂磨擦接种, 具体方法见文献[3]。接种后第 5, 10, 15, 20, 25, 30 d 分别对处理及对照叶片进行酶活性测定。

1.3 酶活性的测定

酶提取液配制参见文献[4, 5]。
取 6 个品种的叶片, 分别称 0.2 g, 加入 0.4 mL 的酶提取液, 冰浴研磨, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液待用。

PPO 测定: 在小试管内依次加入 0.2 mol/L 邻

苯二酚 1.5 mL、0.05 mol/L pH 6.8 的 PBS 1.5 mL、酶液 50 μ L。另取一小试管, 不加酶液作为对照, 室温下反应 1 min, 398 nm 波长下测吸光值。

PA L、POD 测定过程中酶液加入量均为 50 μ L。
PPO 的酶活单位(U)定义为每分钟 50 μ L 提取液在 398 nm 处的吸光值。POD 的酶活单位(U)定义为每分钟 50 μ L 提取液在 460 nm 处的吸光值。PAL 的酶活(U)定义为每分钟 50 μ L 提取液在 290 nm 处的吸光值。

2 结果与分析

酚化合物的氧化酶分为 3 大类, 即通常所说的多酚氧化酶、过氧化物酶和苯丙氨酸裂解酶。其中在植物侵染生理学方面引人注目的是前两种酶。一般认为氧化过程能出现高度抗病的物质。

2.1 POD 测定结果及分析

2.1.1 不同时期不同品种的 POD 值

在接种后的不同时间内取不同品种叶片进行 POD 活性的测定, 结果见表 1。

表 1 接种不同天数后叶片的 POD 值

Tab. 1 POD activity in leaves of control sample in different days after inoculation

品种	接种后天数/d						酶活平均/ U	抗感酶活平均/ U	R/ S
	5	10	15	20	25	30			
R_1	0.052	0.099	0.024	0.138	0.046	0.097	0.076		
R_2	0.029	0.101	0.032	0.063	0.042	0.051	0.053	0.064	
R_3	0.034	0.104	0.030	0.058	0.085	0.072	0.063		0.76
S_1	0.050	0.071	0.076	0.194	0.018	0.095	0.084		
S_2	0.085	0.034	0.114	0.071	0.140	0.142	0.039	0.085	
S_3	0.034	0.104	0.030	0.058	0.085	0.072	0.079		

注: 表中数值为 3 次实验的平均值。

从表 1 可以看出, 抗感品种 POD 差异较小, R/ S 的比值为 0.76, 感病品种略大于抗病品种, 说明在未接种的情况下, 抗感本身体内的 POD 活性差别不大, 此时的酶活性与其遗传背景有密切关系。

2.1.2 抗病品种接种后不同时期酶活性变化规律

分别取接种叶片和对照叶片进行酶活的测定, 比较 POD 的变化值, 结果见图 1。

由上图可以看出, 在接种后前 15 天, 接种植株酶活性均上升, 高于对照。在大约 10 d 左右达到最大值; 然后接种植株酶活性开始降低, 到第 20 天以后, 接种植株酶活性降至最小值, 低于对照; 最后随接种时间的延长, 接种植株的酶活性与对照开始趋于接近。

2.1.3 感病品种接种后不同时期酶活性变化规律

分别取接种叶片和对照叶片进行酶活的测定,

比较 POD 的变化值, 结果见图 2。

感病品种接种后酶活性始终高于对照品种, 其中第 15 天左右与对照的差值达到最大, 然后差异逐渐减小, 最后逐渐趋向平衡。

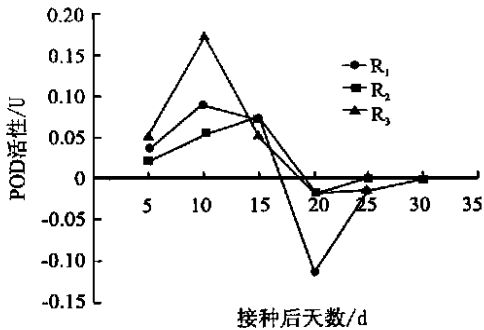


图 1 接种后抗病品种的 POD 动态变化值

Fig. 1 Changes of POD activity in leaves of resistant cultivars after inoculation

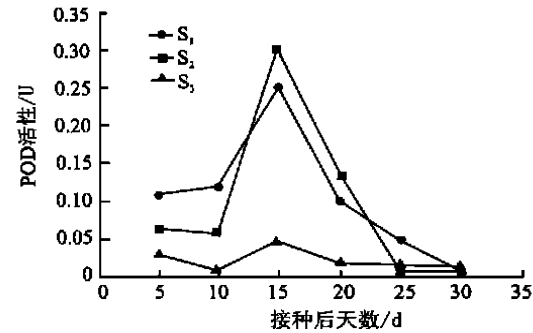


图 2 接种后感病品种的 POD 动态变化值

Fig. 2 Changes of POD activity in leaves of susceptible cultivars after inoculation

2.1.4 病情指数与酶活性上升的关系

测定不同的品系接种 TuMV 后体内过氧化物酶活性,对测定结果进行方差分析和多重比较,结果见表 2.

表 2 POD 酶活性净增值与病情指数

Tab. 2 The increasing POD activity and disease index				
品种	病情指数	酶活升高值/ U	显著水平	
			$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
R ₁	1.2	0.014	a	a
R ₂	3.6	0.022	a	a
R ₃	2.0	0.041	ab	a
S ₁	52.1	0.106	b	a
S ₂	35.3	0.097	b	a
S ₃	40.6	0.033	ab	a

表 3 接种后不同天数对照的 POD 测定值

Tab. 3 PPO activity in leaves of control sample in different days after inoculation								
品种	接种后天数/ d					酶活平均/ U	抗感平均/ U	R/ S
	5	10	15	20	25			
R ₁	0.020	0.069	0.013	0.029	0.028	0.032	0.034	2.43
R ₂	0.027	0.067	0.025	0.049	0.036	0.041		
R ₃	0.017	0.042	0.024	0.025	0.036	0.029		
S ₁	0.006	0.015	0.008	0.014	0.013	0.011	0.014	2.43
S ₂	0.010	0.019	0.025	0.015	0.008	0.015		
S ₃	0.007	0.028	0.010	0.017	0.013	0.015		

2.2.2 接种后抗感品种酶活性的变化规律

测定接种后不同天数接种叶片与对照叶片的 PPO 值,计算两者之间的差值,将数据绘成图 3.

从图 3 可以看出,接种后抗病品种叶片内的 PPO 值迅速升高,而感病品种叶片内 PPO 活性则升高不大,但无论是抗病还是感病品种,接种后叶片内 PPO 活性均大于对照.随接种时间的延长,抗病品种接种株叶片内的 PPO 活性逐渐接近对照植株,从第 15 天起抗感接种株叶片内 PPO 活性与对照的差值已经趋于一致.所以在接种后第 10 天通过测定叶片内 PPO 活性就可以判断其抗病性.

6 次测定的平均酶活净增值与病情指数的相关系数 $r=0.764$,由于接种 15 d 后抗病品种的活性已开始下降,用接种后 15 d 的酶活净增值进行相关分析, $r=0.634$ 相关系数偏低.

从以上的结果分析可以得出以下结论: 对 TuMV 具有不同抗性的萝卜品种体内 POD 活性存在差异,感病品种体内 POD 稍高于抗病品种,差异不显著;接种后抗病品种 POD 活力提高,在第 10 天左右达最高峰,而感病品种在第 15 天达到最高值,前者明显早于后者.此结果表明,萝卜受 TuMV 侵染后,病毒与寄主之间就相互制约互相斗争,其结果是诱导植物体内产生抗性酶系来防范病毒的侵染扩展.而抗病品种体内可能木质素、酚类化合物产生早,能抵御病毒的扩展;而感病品种体内产生抗性物质迟,当病毒一旦与寄主建立寄生关系后,不断扩展破坏机体,导致植株产生症状,同时亦导致 POD 活性迅速升高.

2.2 PPO 测定结果及分析

2.2.1 不同时期不同品种的 PPO 值

在接种后的不同时间内取对照品种叶片进行 PPO 活性的测定,结果见表 3.

从表 3 可以看出,抗病品种的叶片内 PPO 的活性明显高于感病品种,其抗感比为 2.43,并且在苗期内酶活变化不大,所以利用其体内酶活性大小可以对抗性加以评价.

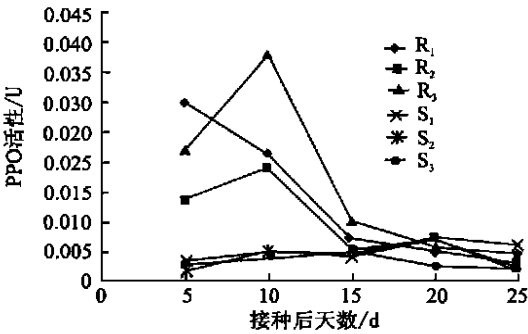


图 3 接种后不同天数抗感品种叶片内 PPO 动态的变化

Fig. 3 Changes of PPO activity in leaves of resistant and susceptible cultivars after inoculation

2.2.3 病情指数与酶活性上升的关系

由表4提供的数据进行相关分析,平均酶活净增值与病情指数的相关系数 $r=0.93$,达显著水平,说明参试材料接种后的酶活净增值与抗病性呈正相关.

表 4 POD 酶活净增值与病情指数

Tab. 4 The increasing PPO activity and disease index				
品种	病情指数	酶活升高值/ U	显著水平	
			$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
R ₁	1.2	0.013	a	a
R ₂	3.6	0.009	a	a
R ₃	2.0	0.015	a	a
S ₁	52.1	0.004	b	b
S ₂	35.3	0.004	b	b
S ₃	40.6	0.003	b	b

表 5 接种后不同天数对照的 PAL 活性

Tab. 5 PAL activity in leaves of control sample in different days after inoculation							
品种	接种后天数/ d					酶活平均/ U	抗感平均/ U
	5	10	15	20	25		
R ₁	0.040	0.053	0.061	0.059	0.060	0.055	0.37
R ₂	0.037	0.043	0.042	0.051	0.052	0.045	
R ₃	0.010	0.009	0.008	0.011	0.015	0.011	
S ₁	0.008	0.010	0.011	0.009	0.020	0.012	0.10
S ₂	0.010	0.003	0.007	0.010	0.018	0.010	
S ₃	0.003	0.004	0.004	0.008	0.009	0.007	

2.3.2 接种后抗感品种 PAL 酶活性变化规律

测定接种后不同天数接种叶片与对照叶片的 PAL 值,计算两者之间的差值,将数据绘成图 4.

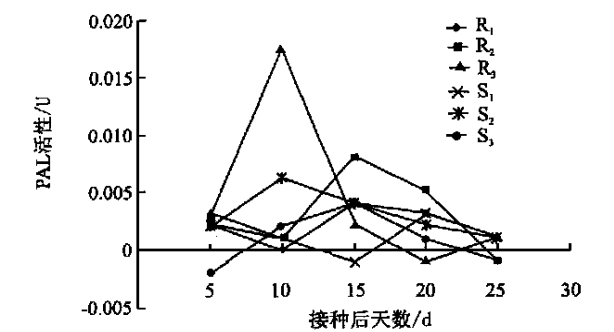


图 4 接种后不同天数抗感品种叶片内 PAL 动态的变化
Fig. 4 Changes of PAL activity in leaves of resistant and susceptible cultivars after inoculation

从图 4 可以看出,抗感品种接种后,其接种株与对照株的 PAL 差值变化很大,有时接种株高于对照,有时低于对照,抗病品种与感病品种并无一定的规律可循.

2.3.3 病情指数与酶活性上升的关系

病情指数与酶活性上升的关系见表 6. 相关系数为 $r=0.084$,说明接种后 PAL 酶活性上升值与材料的病情指数并无多大关系.

综合以上分析可以得出:接种后抗感品种叶片内 PPO 活性均升高,但以抗性品种变化大,体内酶活性迅速升高,且升高值与其抗病性呈正相关.又因未接种株苗期酶活性具有相对稳定性,故测定苗期 PPO 活性即可判断其抗病性,PPO 可以作为衡量抗性的一个生化指标.

2.3 PAL 测定结果及分析

2.3.1 抗感品种不同时期叶片内的 PAL 值

接种后不同时间分别取叶片进行 PAL 酶活性的测定,结果见表 5. 从表 5 可以看出,抗病品种体内的 PAL 活性明显大于感病品种,其比值为 3.7,并且 5 次测定的数值变化不大,保持一个相对稳定的值.说明 PAL 酶活性值在萝卜的幼苗期变化不大,其活性的大小与品种对 TuMV 的抗性有关.

表 6 PAL 酶活净增值与病情指数

Tab. 6 The increasing PAL activity and disease index				
品种	病情指数	酶活升高值	显著水平	
			$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
R ₁	1.2	0.001	a	a
R ₂	3.6	0.003	a	a
R ₃	2.0	0.004	a	a
S ₁	52.1	0.001	a	a
S ₂	35.3	0.003	a	a
S ₃	40.6	0.001	a	a

3 讨 论

1) 萝卜感染 TuMV 后,叶片的过氧化物酶的活性上升,并且长出的叶片明显小于健康叶片,说明叶细胞壁的扩展受阻,延伸性降低,细胞壁硬化.虽然目前对 POD 在植物抗病中的具体作用尚不十分明确,但已有许多研究指出 POD 活性的变化与某些植物的抗病性有关.POD 活性变化与植物抗性正相关^[6~8]、负相关^[9~11]等各种结果均有报道.朱友林等发现无论是未接种的健康植株,还是接种后不同时期的感病植株,POD 活性在同一遗传背景中抗病和感病品系间的差异远远小于不同遗传背景间的差异^[12],表明 POD 活性在病源侵染中的变化

与抗病基因所处的遗传背景有密切关系. 遗传背景不仅决定和影响正常植物的形态特征和生理生化性状, 而且明显影响植物对病毒侵染产生的生理生化反应和变化. 如果在有关研究中采用的供试抗病和感病材料的遗传背景不清或差异较大, 在供试材料不多的情况下很难判断出抗感植物材料间的差异到底是由植物抗病性不同引起的, 还是由遗传背景不同引起的, 从而不可避免的产生一些片面或相互矛盾的结果. 作者认为不同的寄主受到不同的病原菌侵染后, POD 活性的变化不同是正常的; 接种后 POD 活性在抗感不同品种中的变化只能体现植株内的生理变化, 尚难用于抗性的鉴定与评估.

2) 多酚氧化酶广泛存在于植物之中, 一方面能

氧化体内酚类, 产生活性很高、对病原菌有很高毒性的醌类物质, 另一方面参与木质素的合成. 所以高水平的 PPO 是植物抵抗侵染的保卫反应, 其活性水平高有利于抗病. 研究表明苗期萝卜叶片中 PPO 活性高低与抗性呈正相关, PPO 可以作为抗性大小的衡量指标.

3) 综合以上 3 种酶的分析可以看出, 对抗性程度的判断首先要采集大量不同萝卜品种的叶片, 测定其目标酶的活性, 根据抗性鉴定与酶活性的相关关系, 可将各种萝卜进行抗性排序. 若要判断某种萝卜的抗性, 只要测其相关酶的活性, 在萝卜抗性序列中比较, 即可找到所测萝卜品种的抗性位置.

参考文献

- [1] 李德保, 周家炽. 萝卜花叶的病毒类群和复合侵染的研究初报[J]. 植物保护学报, 1964, 3(2): 155~162.
- [2] 韩素中, 汪隆植, 濮祖芹. 南京市郊萝卜病毒病的调查和病原鉴定[J]. 南京农业大学学报, 1988, 11(3): 39~43.
- [3] 方仲达. 植病研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1998.
- [4] 李靖. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 277~282.
- [5] 波钦诺克著. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [6] 张晓葵, 王保仁, 邓江明. 水稻品种对细菌性条斑病菌的抗性与过氧化物酶及酯酶同工酶关系[J]. 湖南农业科学, 1994, 4: 39~41.
- [7] 李保聚, 李风云. 黄瓜不同抗性品种感染黑星病菌后过氧化物酶和多酚氧化酶的变化[J]. 中国农业科学, 1998, 31(1): 86~88.
- [8] 史益敏, 陶懿伟, 张健. 系统感染 TMV 诱导的番茄叶片过氧化物酶[J]. 上海农学院学报, 1995, 13(1): 31~35.
- [9] 朱睦元. 大麦品种对 BYMV 的抗性与过氧化物酶、酯酶的关系研究[J]. 植物保护学报, 1989, 16(1): 43~48.
- [10] 沈其益. 棉花感染枯萎病后过氧化物酶同工酶的变化[J]. 植物学报, 1987, 20(3): 108~113.
- [11] 徐启新, 余纪柱, 陈世均. 黄瓜苗期过氧化物酶活性的变化规律及其与抗萎病的关系[J]. 上海农业学报, 1994, 10(3): 58~62.
- [12] 朱友林, 刘纪麟. SOD 和 POX 与玉米对大斑抗性的关系[A]. 中国首届博士后学术大会论文集[C]. 北京: 国防工业出版社, 1993.

(责任编辑: 李春丽)