

诱导杨树抗溃疡病机理的研究*

杜建玲 项蔚华 沈瑞祥

摘要 用 100、500、1 000ppm 浓度的 5406 细胞分裂素和稀土分别诱导群众杨的离体枝条,3 d 后进行接种。实验证明,用“5406”发病率降低了 63.3%~70%,病情指数降低了 51.5~65.2;用稀土发病率降低了 60%~70%,病情指数降低了 29.1~73.9。接种后的群众杨皮部 SOD 活性在 72~96 h 内达到最高峰,以后逐渐下降,并趋于稳定;呼吸强度 48 h 达到最大值,96 h 明显减弱,并基本稳定。发病后,皮部总蛋白含量增加 1.7~4.4 倍(对照总蛋白含量仅增加 0.9 倍),增加的量随诱导剂的浓度增大而增多。

关键词 群众杨、杨树溃疡病、诱导抗性、抗性育种

杨树溃疡病(*Dothiorella gregaria* Sacc.)是杨树的重要病害。对于杨树溃疡病的研究,我国很多学者做了大量的工作,但如何提高杨树本身抗病性的研究报道不多。本试验旨在探讨小美旱杨树体内的生理生化变化,为杨树抗性育种提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2 年生群众杨 [*Populus × xiaozhuanica* W. Y. Hsu et Liang cv. 'Popularis'] 苗木来自北京大兴县六合庄林场;杨树溃疡病菌是从北京杨上分离纯化的菌株,经回接后保存备用;5406 细胞分裂素由浙江省嘉善县微生物厂生产;稀土由河南省商丘冶炼化工厂生产。

1.2 方法

1.2.1 配制诱导剂溶液 将两种诱导剂(5406 细胞分裂素和稀土)分别配成 100、500、1 000 ppm 的水溶液。

1.2.2 取样方法 1991 年 11 月 16 日取 2 年生群众杨粗细均匀的枝条,剪成长 20 cm 的小段,将下端分别浸泡在不同浓度的诱导剂溶液中诱导 3 d;以清水浸泡的枝条作对照。用牙签接种法接种病原菌,每根枝条接 3 个点(均匀分布)。每天观察发病情况,1991 年 12 月 15 日统计发病率及病情指数。同时将另一部分枝条以同样条件诱导并接种,而后测定生理生化指标。在接种点后 3 cm 处取样,将 3 次重复的平均值作为每种处理的结果(以对照测定为参考)。

1.2.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 按照朱广廉等^[1]的方法,利用 SOD 抑制氮兰四唑(NBT)在荧光下进行还原(一个酶活单位为 NBT 的还原抑制到 50% 时所需的酶量)。将群众杨枝条诱导后接种病原菌,每 12 h 从接种点 3 cm 处取树皮,测定其 SOD 活性,待发病后再测定一次。

1.2.4 树皮总蛋白含量的测定 用考马斯亮蓝法^[2]测定树皮总蛋白含量。

1993—03—24 收稿。

杜建玲讲师(河北林学院 河北保定 071000);项蔚华,沈瑞祥(北京林业大学)。

* 本文为第一作者的硕士论文之一。

(1)制作标准曲线 配制一系列的牛血清标准蛋白溶液(每 0.5 mL 标准溶液中含牛血清蛋白 0、10、20、30、40、50、60 μ g)。取标准蛋白溶液 0.5 mL,加 4 mL 考马斯亮蓝溶液,反应 3 min,测定 $\lambda=595$ nm 的 OD 值,绘出标准曲线。

(2)样品蛋白含量的测定 将树皮样品研磨后,用 pH7.8 的磷酸缓冲液提取酶液,然后在 0 $^{\circ}$ C 条件下离心,离心后取酶液 0.5 mL,加 4 mL 考马斯亮蓝溶液,反应 3 min,测定 $\lambda=595$ nm 的 OD 值,查标准曲线,计算总蛋白含量。

1.2.5 呼吸作用的测定 利用 RS—5100 型测氧仪(上海雷磁仪器厂生产)测定氧的消耗量。在距接种点 3 cm 处用打孔器(直径 7 mm)取 6 片树皮(圆片 6 片),加水 15 mL,测定水中溶氧量的变化,每隔 1 min 记录一次溶氧量的读数,根据读数的差值(即每分钟的耗氧量)画出呼吸曲线,求出反应初速度。接种后每隔 24 h 测定树皮的呼吸强度,发病后再测定一次。

2 结果与分析

2.1 诱导后的群众杨枝条发病情况

表 1 表明,诱导 1 个月后的群众杨的溃疡病发病率和病情指数均降低,“5406”诱导后发病率降低了 63.3%~70%,病情指数降低了 51.5~65.2;稀土诱导后发病率降低了 60%~70%,病情指数降低了 29.1~73.9。诱导作用的效果与浓度有关,浓度越大,效果越好。两种诱导剂浓度为 100 ppm 时的病情指数均比对照降低 50%左右,说明两种诱导剂的 3 个浓度,均可提高群众杨的抗性。

2.2 诱导后群众杨树皮 SOD 活性的变化

表 2 方差分析表明,两种诱导剂诱导群众杨后,不同时间及浓度间的酶活性存在着显著差异。诱导后树皮的 SOD 活性均高于对照。随着诱导浓度的增大,SOD 活性也增高,不同时间内增加的幅度 48 h 为 12.7%~28.6%;72 h 为 19.7%~39.8%;96 h 为 8.6%~44.2%;120 h 为 5.9%~60.0%;发病后为 17.9%~76.4%。诱导后的 SOD 活性高于健康的正常枝条。而正常枝条又高于对照。接种后酶活性的变化有一定规律,“5406”和稀土的上述 3 个浓度诱导后,SOD 活性分别在 72 h 和 96 h 达到最大值,而正常枝条是在逐渐下降。因此推断抗病作用是在诱导后经过一段时间才表现的。SOD 是植物体内普遍存在的一种酶,它能够清除植物体内的超氧自由基。在正常情况下,体内自由基的产生与清除处于动态平衡状态,自由基浓度很低,不会引起伤

表 1 诱导后的群众杨枝条发病情况

诱导剂	浓度 (ppm)	发病率 (%)	病情指数	校正后的病情指数
5406 细胞分裂素	100	36.7	44.2	48.5
	500	33.3	36.2	39.8
	1 000	30.0	31.7	34.8
稀 土	100	40.0	55.5	60.9
	500	36.7	39.9	43.6
	1 000	30.0	23.8	26.1
CK	—	100.0	91.2	100.0

表 2 诱导的群众杨接种后树皮 SOD 活性的变化

[单位:u/h·g(fw)]

诱导剂	浓度 (ppm)	测 定 时 间(h)				发病后
		48	72	96	120	
5406 细胞分裂素	100	874.29	1 039.58	990.08	748.95	737.54
	500	858.09	1 199.74	1 177.99	851.94	813.30
	1 000	958.95	1 133.07	1 093.75	962.43	921.82
稀 土	100	980.24	1 062.68	1 089.92	848.48	811.91
	500	997.60	1 028.02	1 049.28	1 001.84	954.33
	1 000	976.56	1 026.72	1 169.77	1 131.55	1 102.89
CK	—	775.59	857.99	828.62	795.94	625.34
正常枝条 ^①	—	843.62	846.44	834.69	734.98	—

①指不作任何处理的健康枝条。

害。当受到逆境时,自由基浓度增加,平衡被破坏,导致细胞膜的完全性破坏。SOD是活性氧(O_2^-)的净化剂。通过去除活性氧等对机体起保护作用^[3,4]。

2.3 诱导后的群众杨树皮总蛋白含量的变化

群众杨离体枝条诱导接种后120 h和发病后各测定一次树皮总蛋白含量,对结果(表3)进行方差分析,发病前各处理间总蛋白含量无显著差异,发病后差异显著。发病前各处理的总蛋白含量与健康的正常枝条相近,说明枝条的总蛋白含量基本一致;发病后诱导枝条的总蛋白含量比发病前增加1.7~4.4倍,而对照只增加了0.9倍,说明诱导促使树皮的总蛋白含量增加。对照总蛋白含量增加可能是由于病原菌丝的出现而产生,所测蛋白的量也包含了菌丝蛋白。诱导后的群众杨

表3 诱导的群众杨枝条发病前后总蛋白含量的变化

药剂	浓度 (ppm)	总蛋白含量[$\mu\text{g/g}(\text{fw})$]	
		发病前	发病后
5406 细胞 分裂素	100	539.81	1 707.09
	500	515.44	2 086.61
	1 000	533.36	2 504.85
稀 土	100	575.05	1 556.60
	500	568.63	2 032.14
	1 000	537.55	2 896.23
CK	—	532.95	1 026.62
正常枝条	—	574.88	—

发病轻,菌丝生长少,而蛋白含量却增加较多,说明增加的部分确由树皮蛋白增多引起^[5,6]。群众杨诱导后总蛋白含量增加,并与抗病能力呈正相关,证明诱导后产生了病原相关蛋白。

2.4 诱导后群众杨呼吸的变化

表4表明,接种后48 h呼吸强度最大,96 h明显减弱,以后便无明显变化。说明接种病原菌后植物有一个抵御侵染的过程。使得呼吸强度增大,以后便逐渐恢复正常状态。与正常枝条的呼吸强度相近。而没有经过诱导的对照枝条呼吸一直保持在较高的水平,发病后的呼吸强度大于正常枝条,可以认为,诱导后呼吸的变化与抗病性有关,这也是使发病率降低的一个原因。

表4 诱导后的群众杨接种耗氧情况

[单位:mg/(L·min)]

药剂	浓度 (ppm)	测定时间(h)					发病后
		48	72	96	120		
5406 细胞 分裂素	100	0.079	0.075	0.044	0.052	0.051	
	500	0.079	0.077	0.039	0.040	0.048	
	1 000	0.078	0.077	0.047	0.049	0.051	
稀 土	100	0.083	0.073	0.044	0.043	0.050	
	500	0.079	0.074	0.049	0.051	0.064	
	1 000	0.076	0.075	0.048	0.051	0.061	
CK	—	0.070	0.068	0.051	0.060	0.068	
正常枝条	—	0.054	0.053	0.050	0.050	—	

3 讨 论

5406 细胞分裂素和稀土诱导群众杨后,产生了对溃疡病的抗性,群众杨生理变化与抗病性密切相关。关于诱导抗性中植物产生PR蛋白(病原相关蛋白)与抗病、几丁酶与抗病关系,已有过报道^[5~7]。由于几丁酶与木质化有关,若能弄清几丁酶的变化,有利于抗病机理的探索。此外,本试验中总蛋白含量的增加,是否包含PR蛋白,有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学实验.北京:北京大学出版社,1990.
- 2 李琳,焦新之.应用蛋白染色剂考马斯亮蓝测定蛋白质的方法.植物生理学通讯,1980,(6):52~55.

- 3 王建华,刘鸿先,徐 同.超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用.植物生理学通讯,1989,(1):1~7.
- 4 李柏林,梅慧生.燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系.植物生理学报,1989,15(1):6~12.
- 5 杜良成,王 钧.病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用.植物生理学通讯,1990,(4):1~6.
- 6 Metraux J P, Bouer T H. A Pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. physiological and Molecular Plant Pathology, 1986,28:161~169.
- 7 张世明.高等植物几丁酶研究进展.植物生理学通讯,1989,(1):8~13.

A Study on the Mechanism of Induced Poplar Resistance to Canker Disease

Du Jianling Xiang Weihua Shen Ruixiang

Abstract The branches of *Populus × xiaozhuanica* cv. 'Popularis' are induced by rare-earth and *Streptomyces jingyanensis* 5406 (three concentrations of 100, 500 and 1 000 ppm in both inducers), then inoculated with *Dothiorella gregaria*. After challenged inoculation, the incidence of disease and disease index dropped with a reduction of 60%~70% and 29.1~73.9 for the former and 63.3%~70% and 51.5%~65.2% for the latter respectively. The mechanism of resistance to canker disease is a series of physiological changes taking place in the bark of branches after induction. The activity of superoxide reached the maximum after 72~96 hours and then dropped gradually and tended to be stable, the activity of SOD in the induced branches are higher than that in the control ones; the respiration came to the maximum after 48 hours and got weak after 96 hours when disease is going on the total protein of induced branches increased by 2.7~5.4 times while that of the control only 1.9 times. The changes above are related to the concentration of inducers with the larger the concentration the better the effect.

Key words *Populus × xiaozhuanica* cv. 'Popularis', poplar canker disease, induced resistance, resistance breeding

Du Jianling Lecturer (Hebei Forestry College Baoding, Hebei 071000); Xiang Weihua, Shen Ruixiang (Beijing Forestry University).