

木麻黄对青枯病的抗性及其与细胞膜透性和过氧化物酶同工酶关系的探讨

梁子超 陈柏铨**

(林学系)

提 要

病区残存10年生以上的木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* Lin) 不同无性系的幼苗经青枯假单胞菌 (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith) 菌系SC—2人工接种后, 发病症状可以划分为青枯、半枯、黄萎、枝枯四个类型; 其对青枯病的抗性有差异, 发病率较低的单株有3、11、15、19、和粗4, 发病率较高的单株有1和2。用电导率方法测定各无性系幼苗的相对透性和用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳测定过氧化物酶同工酶的结果表明, 细胞膜的相对透性和过氧化物酶同工酶的第4条谱带的比移值与植株感病率有一定的关系; 过氧化物酶同工酶的谱带数和过氧化物酶的活性与感病率的关系不大。各无性系的过氧化物酶与相对透性之间也有一定的相关关系。

木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* Lin) 青枯病是由青枯假单胞菌 (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith) 引起的维管束病害, 它严重危害广东沿海木麻黄防护林带。过去, 多种经济作物对青枯病的抗性和抗病生理有很多的研究^[1], 但关于木麻黄青枯病的研究极少^[4]。在植物抗病育种中, 了解植物的抗病性和抗病生理是很重要的。本研究的目的是探讨病区内残存10年生以上单株的抗性以及它和细胞膜透性、过氧化物酶同工酶的相互关系。

材 料 与 方 法

试验材料 在电白县港口林场选取残存的10年生以上的木麻黄1、2、3、8、11、15、19、39、40、粗2、粗3、粗4等12个单株 (这些单株的小叶数为7—10) 作为测定的材料; 并在广州石牌选取感病的木麻黄单株53作比较。

从这些单株上选取树干萌芽条或幼嫩小枝, 用激素处理无性繁殖法促使小枝出根, 出根后移至装有无菌砂壤土的花钵中定植。60天苗测定细胞膜的相对透性和过氧化物酶同工酶, 180天苗接种测定无性系的抗性。

* 本文经林学系答辩委员会陆大京研究员、庄王、黎毓干教授、岑炳沾讲师审议通过, 并经王庄教授、黄坊英付研究员审阅, 一并表示感谢。

** 1978—1981年研究生

接种体和接种 接种试验用的接种体是青枯假单胞菌菌系SC—2^[1]。菌苔用无菌蒸馏水制成细胞悬浮液于室温保存。用时从保存的悬浮液取出菌液在不含 kelman^[10] 的 2, 3, 5—氯化三苯基四氮唑 (TTC) 的 TTC 培养基上 32℃ 活化 24 小时, 再移在相同的培养基上 32℃ 培养 48 小时。用清水把菌苔制成含菌量为 10⁹ 个细胞/毫升的菌液供接种用。

接种是用锋利的解剖刀伤根, 每株淋 15 毫升菌液, 设同样伤根淋无菌水作对照。处理后放在 28—32℃, 人工光照 12 小时的温室内, 逐日观察和淋水。第 20 天逐株镜检发病和死亡的原因, 统计发病率和死亡率。

细胞膜相对透性的测定 每个无性系取移植 60 天的苗 3—5 株, 用自来水冲洗净, 蒸馏水再冲洗一次, 干净滤纸吸干。取主茎, 从顶端向下, 切成为 1 厘米的小段, 把顺序相同的小段合并。按主茎从上而下的顺序, 每 0.2 克为一个样品。因各无性系苗木的生长差异, 制成的样品 2—7 个。每个 0.2 克的样品放入装有 10 毫升双蒸蒸馏水容量为 25 毫升的三角瓶中。如果最后的小段总重量不足 0.2 克, 同样按 1 : 50 (重量: 体积) 比例加入双蒸蒸馏水, 另设双蒸蒸馏水作对照, 并每瓶加塑料盖密封。

根据 Wilner 的方法^[5]略加修改, 将制好的样品放在 32℃ 温箱内静置 8 小时。取出用 DDS—11A 型电导率仪测定电导率。测定后, 把去盖的三角瓶放在已沸腾的压力锅内, 用流动蒸汽破坏细胞膜 10 分钟, 立即取出, 置室温下冷却, 待温度与室温平衡再测电导率。然后按下列公式计算相对透性, 再取每个无性系的样品测定平均值作为其细胞膜的相对透性。

$$\text{相对透性 (\%)} = \frac{S_0 - C_0}{S_1 - C_1} \times 100$$

S_0 为样品静置 8 小时后的测定的电导率, S_1 为样品用蒸汽破坏细胞膜后测定的电导率, C_0 为双蒸蒸馏水静置 8 小时后测定的电导率, C_1 为双蒸蒸馏水蒸汽加热后再测定的电导率。

过氧化物酶同工酶的测定 小心挖出移植 60 天的苗木, 整株用自来水冲洗干净, 蒸馏水再冲洗, 并用滤纸吸干, 取其小枝、根称重, 剪碎, 放在冰浴内预冷的研钵中, 枝按 1 : 5, 根按 1 : 50 (重量: 体积) 的比例加入提取缓冲液^[13] (0.1M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 其中含 0.5M 蔗糖, 0.006M 抗坏血酸, 0.006M 半胱氨酸), 在冰浴中迅速匀浆。匀浆后在冰箱内用定性滤纸过滤。滤液立即用来测定过氧化物酶同工酶。

电泳是按常规的凝胶园盘电泳方法^[2]进行, 选用过硫酸铵催化系统, 不用成层胶, 只用凝胶浓度为 7%, pH8.9 的分离胶。同一批样品测定的胶柱一次制胶, 聚合完后放在冰箱内保存, 供在 1—3 日内测定用。在 12 管的园盘电泳槽每次测定 3 个无性系的样品, 每管加样 0.025 毫升提取过滤液。因提取缓冲液内含 0.5M 蔗糖, 样品不再加 50% 的蔗糖液。用 0.01% 的溴酚蓝为前沿指示剂。加样后电泳槽放在冰箱内, 在电压 180—270 伏, 电流 12—24 毫安的条件下, 电泳时间 60—80 分钟。电极缓冲液只用三次。

电泳完毕后, 取出胶柱放在蒸馏水中, 再取出放入抗坏血酸—联苯胺染色剂^[11] (取 2 克联苯胺溶于 18 毫升文火加热的冰醋酸中, 再加 72 毫升蒸馏水制成联苯胺储存

液, 取联苯胺储液20毫升, 加入70.4毫克抗坏血酸, 20毫升0.6%过氧化氢, 60毫升蒸馏水组成染色剂) 中。室温下染色30分钟, 并同时记录酶谱每条带出现的时间, 计算相对活性^[11]。染色完的胶柱取出用蒸馏水洗涤后放在7%的冰醋酸中保存, 画图记录。

结果与分析

(一) 病区残存单株抗性的差异 在人工接种青枯假单胞菌菌系SC—2的情况下, 各无性系病株的症状有差异, 可以划分为四个类型。青枯型: 植株感染后, 小枝失水收缩, 上部小枝下垂, 出现典型的全株萎蔫。从感病症状出现到全株萎蔫速度较快, 只2—3天。在显微镜下检查, 茎和顶部小枝均有致病菌存在, 出现这一类型的无性系有粗3、53。半枯型: 植株感染后, 先半边的枝条失水收缩, 顶端小枝下垂, 在出现病状的小枝、茎亦有致病菌存在, 整株的萎蔫较慢, 一般在半边枯后7天左右才扩展到整株死亡, 出现这一类型的无性系有粗2。黄萎型: 植株感病后, 生长缓慢或停顿, 小枝变黄, 这时小枝无病原菌存在, 病菌主要存在茎的维管束内。随感染的加重, 有些小枝干枯脱落, 直到发病后期植株才出现典型的萎蔫症状, 出现这个类型的无性系有1、2、3、11、15、19。枝枯型: 仅个别小枝失水收缩下垂, 其余部分仍正常生长, 未见死亡, 出现这一类型的无性系有粗4。

表1 各无性系接种青枯假单胞菌菌系SC—2的发病情况

单株号	接种株数	发病率(%)	死亡率(%)
1	18	38.9	38.9
2	5	40.0	40.0
3	14	7.1	7.1
11	19	10.5	10.5
15	14	7.1	7.1
19	36	11.1	11.1
粗2	40	25.0	25.0
粗3	39	20.5	20.5
粗4	38	5.3	0
53	30	43.3	43.3

各个无性系在人工接种青枯假单胞菌菌系SC—2后表现出的发病率和死亡率亦不相同。表1的数字表明, 在室内人工接种条件下, 无性系粗4虽有枝枯症状, 但不死亡; 无性系3、11、15、19的发病率和死亡率较低; 无性系粗2和粗3的发病率和死亡率中等; 无性系1、2的发病率和死亡率较高, 差不多和感病的无性系53相仿。

(二) 病区残存单株抗病生理的差异

1. 各无性系细胞膜透性的差异: 每个无性系苗木主茎的细胞膜相对透性表现为由上而下逐渐增加的变化规律。比较各无性系主茎的细胞膜相对透性, 它们之间存在差

异(表2)。这些差异有些是不显著的,有些是较显著和显著的。

将各无性系主茎平均相对透性和发病率进行相关分析(为了满足数字符合正态分布的要求,本试验结果的百分数在进行统计分析时均进行 $X = \sin^{-1} \sqrt{p}$ 的变换),其相关系数 $r = 0.635$,根据相关系数显著性检验,当 $df = 7$ 时, $r_{0.1} = 0.582$, $r_{0.05} = 0.666$, $r > r_{0.1}$,所以各无性系的平均细胞膜相对透性和发病率之间有较显著的直线关系。可以初步认为,植株细胞膜的相对透性低的其抗病性较强,相对透性高的其抗病性较差。但因 r 仅大于 $r_{0.1}$,所以还未能作出最后结论。

表2 不同无性系苗木主茎相对透性比较

单株号	1	2	3	8	11	15	19	39	40	粗3	粗4	53
相对透性(%)	39.13	38.25	26.70	28.78	37.36	28.93	40.90	33.86	38.05	34.24	33.78	40.56
t检验a			*	*		*		(*)		(*)	(*)	

a: 各无性系分别与无性系53进行t检验

2. 各无性系的过氧化物酶同工酶的差异: 各个无性系健康的苗木本身的小枝和根的过氧化物酶同工酶的酶谱是不相同的,一般表现为小枝的谱带比根的多。各个无性系之间的小枝、根的过氧化物酶同工酶谱亦不相同,几乎找不出共同的谱带(图1)。用过氧化物酶同工酶谱带数和发病率进行相关分析,各无性系的谱带数和发病率的相关系数 $r_{\text{根}} = 0.090$,而小枝的谱带数和发病率的相关系数 $r_{\text{枝}} = 0.089$,均小于 $r_{0.1}$,所以小枝、根的过氧化物酶同工酶谱带数与发病之间无显著的相关关系。

把同一胶柱上每一条过氧化物酶同工酶谱带宽度按加权法相加为总宽。用总宽与发病率进行相关分析发现,根的总带宽与发病率的相关系数 $r_{\text{根}} = 0.246$;枝的总带宽与发病率的相关系数 $r_{\text{枝}} = 0.041$ 。进行相关显著分析表明, $r_{\text{根}}$ 、 $r_{\text{枝}}$ 均小于 $r_{0.1} = 0.549$ 。所以根、枝的过氧化物酶同工酶总带宽与植株发病率无显著的相关。染色用的抗坏血酸—联苯胺染色剂在染色时谱带出现的时间快慢可以反映出每条谱带的相对活性。从染色的情况表明,带宽可以代表酶的活性。所以,过氧化物酶的活性与发病率的关系亦可能不显著。

用各无性系过氧化物酶同工酶顺序相同谱带的比移值(R_f)和发病率的相关分析发现,根的各条谱带的比移值与发病率无显著的关系,小枝的各条谱带的比移值除第4条谱带外亦无显著的关系,仅小枝的第4条谱带的比移值和发病率的相关系数 $r = 0.672$ 。进行相关显著分析表明, $df = 8$ 时, $r_{0.05} = 0.632$, $r_{0.01} = 0.765$, $r_{0.05} < r < r_{0.01}$,所以小枝的过氧化物酶同工酶第4条谱带的比移值和发病率的相关关系是显著的,随比移值的增大,植株的发病率增高,但因 $r < r_{0.01}$,所以还未能作出最后的结论。

各无性系的枝条过氧化物酶同工酶第4条谱带的比移值除了与发病率有显著的关系外,与无性系细胞膜的相对透性亦有显著关系,其相关系数 $r = 0.594 > r_{0.05}$,表现为随比移值的增大而细胞膜的相对透性逐渐增高。但因 $r < r_{0.05}$,所以亦未能作出最后的结论。

讨 论

采自电白县港口林场木麻黄病区部分残存单株无性繁殖的苗木,经室内人工接种青枯假单胞菌菌系SC—2鉴定,其抗病性不同,有些抗性较高,如无性系3、11、15、19、粗4;有些抗性中等,如粗2、粗3;有些抗性较低,如1、2两个无性系,与石牌选出的感病无性系相差不大。因此,病区残存单株需经严格测定后才能确定其真实的抗病性。

青枯型病株迅速凋萎,半枯型和黄萎型病株死亡较慢,枝枯型病株发病而不死亡,均表明寄主的水平抗性存在差异。因此,在苗期筛选无性系的抗病性时,应当统计各症状类型的数值,作为鉴定寄主抗性的一个指标。

同一无性系的苗木其抗病性按理应当一致。但在室内人工接种条件下,苗木的感病程度并不一致,感病有先有后,或者有些感病,有些不感病。因此一次鉴定的结果,不一定能反映出单株抗病的实质,必须经多次,而且在多种条件下反复鉴定,才能确定一个单株的真实抗病性。

细胞膜的透性与植物抗病性之间的相关关系过去有许多研究,有人认为细胞膜透性与植株的抗病性有关^{[10][10]},有人认为无关^[18]。根据本实验的结果表明,各无性系苗木主茎的细胞膜相对透性和人工室内接种鉴定的发病率之间有相关关系,而且小枝的过氧化物酶同工酶第4条谱带的比移值与细胞膜的相对透性之间亦有相关,这可能表明,存在于细胞膜的过氧化物酶^[10]的成分和植物的抗病性有一定的关系。

过氧化物酶的活性与植物抗病性之间的相关关系过去也有不少的研究。有人认为,过氧化物酶的活性与植物的抗病性有关^{[8][12][14][15]}也有人认为过氧化物酶的活性与植物的抗病性无关^[8]。关于过氧化物酶同工酶与抗病的关系,有人认为抗病品种和感病品种的过氧化物酶同工酶谱相同^[17],亦有些实验结果表明,抗病品种和感病品种的过氧化物酶同工酶谱是变化不定的^[9]。本试验结果表明,抗性不同的无性系其过氧化物酶同工酶谱不同,过氧化物酶同工酶谱带数、过氧化物酶活性均与抗病无关,但过氧化物酶同工酶的小枝酶谱中第4条谱带的比移值与发病有一定的关系,可以推测,过氧化物酶某些微量的特殊同工酶成分与植物的抗病性有关。

参 考 文 献

- [1] 梁子超、陈小华,1982,木麻黄青枯菌小种和菌系的鉴定,《华南农学院学报》3(1) 157—67。
- [2] 莽克强、徐乃正、方荣祥编,1975,《聚丙烯酰胺凝胶电泳》,科学出版社。

- [3] Andreev, L. V. , and M. Show. 1965. A note on the effect of rust infection on peroxidase isozymes in flax. *Can. J. Bot.* 43: 1479-1483.
- [4] Bakshi, B. K. Forest Pathology—Principles and Practice in Forestry. P148-153. Published by the Controller of Publications, Delhi India. 1976. 400 pp.
- [5] Bir, R. E. and W. J. Bramlage. 1973. Assessing ion leakage from apple fruit tissue. *Hortscience*. 8: 175—176.
- [6] Buddenhagen, I. W. and A. Kelman 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathology* 2: 203-230.
- [7] Daly, J. M. 1972. The use of near-isogenic lines in biochemical studies of the resistance of wheat to stem rust. *Phytopathology*. 62: 392—400.
- [8] Fehrman, H. and A. E. Dimond 1967. Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. *Phytopathology* 57: 69—72.
- [9] Fric, F. Oxidative enzymes. In *Physiological plant pathology*. Edited by R. Heitefuss and P. H. Williams. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1976. 890pp.
- [10] Kelman. A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrozlium medium. *Phytopathology*. 44: 693—695.
- [11] Liu, E. H. 1973. A simple method for determining the relative activities of individual peroxidase isozymes in a tissue extract. *Analytical Biochemistry*. 56: 149—154.
- [12] Lovrekovich, L., H. Lovrekovich and M. A. Stahmann. 1968. The importance of peroxidase in the wildfire disease. *Phytopathology*. 58: 193—198.
- [13] Macko, V., G. R. Honold, M. A. Stahmann. 1967. Soluble proteins and multiple enzyme form in early growth of wheat. *Phytochemistry*. 6: 465-471.
- [14] Macko, V., W. Woodbury and M. A. Stahmann. 1968. The effect of peroxidase on germination and growth of *Puccinia graminis* F. sp. *tritici*. *Phytopathology*. 58: 1250—1254.
- [15] Rama Raje Urs, N. V. and J. M. Dunleavy. 1974. Bactericidal activity of horseradish peroxidase on *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*. *Phytopathology*. 64: 542—545.
- [16] Scheffer, G. P., J. C. Walker. 1953. The physiology of fusarium wilt

- of tomato. *Phytopathology*. 43: 116—125.
- [17] Stavely, J. R. and E. W. Hanson. 1967. Electrophoretic comparison of resistant and susceptible *Trifolium paratense* noninoculated and inoculated with *Erysiphe polygoni*. *Phytopathology*. 57: 482—485.
- [19] Wheeler, H. and P. Hanchey. 1968. Permeability phenomena in plant disease. *Ann. Rev. Phytopathology*. 6: 331—350.
- [19] Willions, P. H., N. T. Keen. 1967. Relation of cell permeability alteration to Water congestion in cucumber angular leaf spot. *Phytopathology*. 57: 1378—1385.

PRELIMINARY STUDY ON THE SUSCEPTIBILITY OF *CASUARINA EQUISETIFOLIA* TO *PSEUDOMONNAS* *SOLNACEARUM* AND ITS RELATION TO THE PERMEABILITY OF THE CELL MEMBRANE AND PEROXIDASE ISOENZYMES

Liang Zi-chao

Chen Bo-qaen

(Department of Forestry)

ABSTRACT

The susceptibility of 12 clones of *Casuarina equisetifolia* taken from the diseased plantation on the coastal wind-break belts in South China was studied under controlled conditions after inoculation by *Pseudomonas solanacearum*. Various symptoms of the disease and different degrees of susceptibility were observed among these clones and some clones with lower percentage of infection have preliminarily been obtained. There was a relationship in a significant degree between the susceptibility of the clones and the relative permeability of the cell membrane and also the R_f value of the fourth band of the peroxidase isoenzyme.

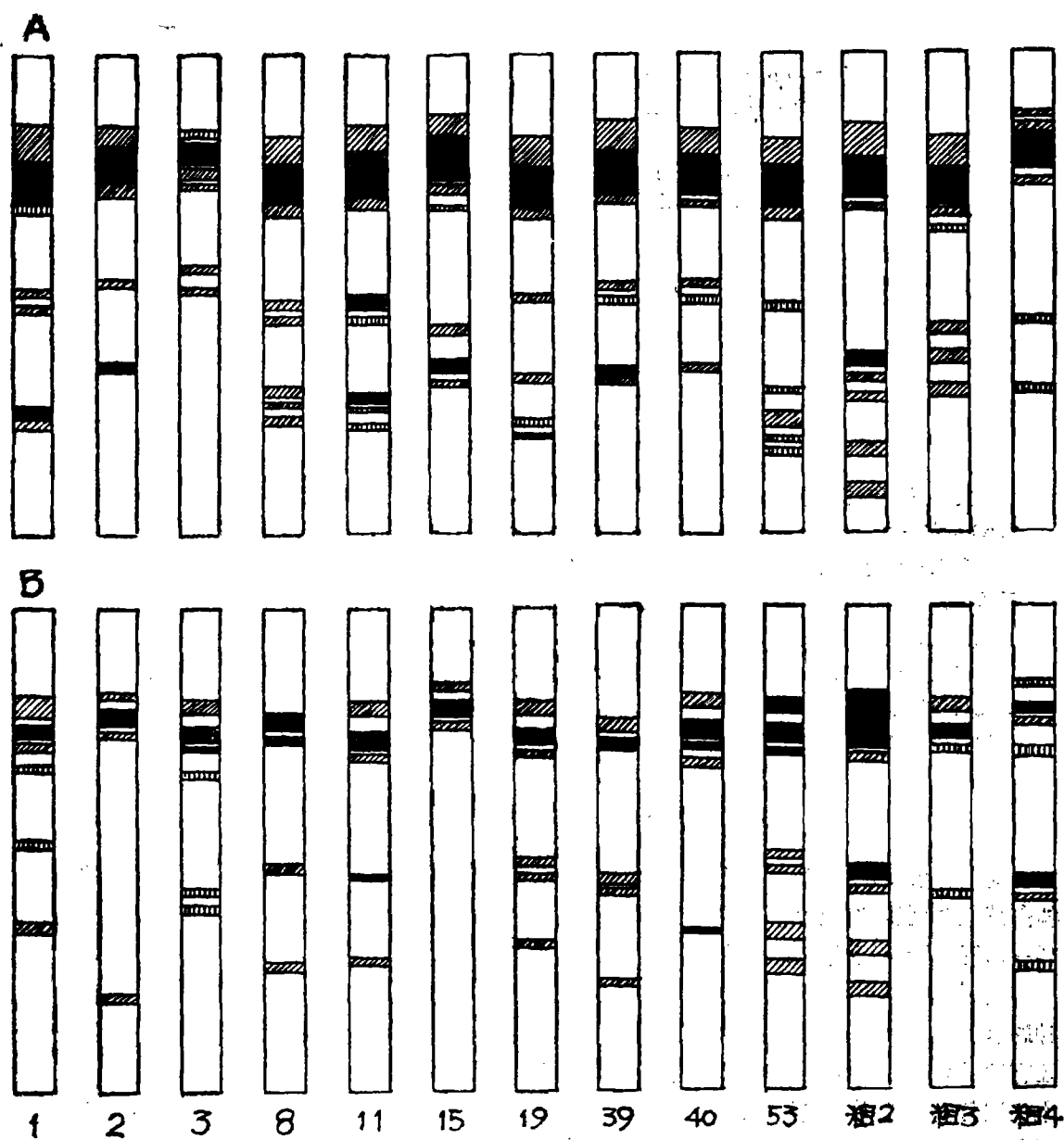


图1 各无性系枝(A)、根(B)过氧化物酶同工酶谱

■ 颜色深的谱带

▨ 颜色较浅的谱带

▤ 颜色浅的谱带