

大叶相思白粉病感病和抗病叶片 三种酶活性的比较研究*

岑炳沾 黄丽芳 郑慧勤

(林学系)

提 要

大叶相思叶片对白粉菌感病性的生化测定结果表明,抗坏血酸氧化酶活性和过氧化物酶同功酶活性随三个树龄级而增加,老龄抗病叶比幼龄感病叶活性高。补充抗坏血酸可使感染白粉菌的叶片转绿,延缓侵染斑的扩展。处理24小时后,感病嫩叶的抗坏血酸氧化酶活性显著提高,我们认为,叶片两种酶的活性与植株的抗性有关。

大叶相思 (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) 的调查试验中发现,白粉病 (*Oidium* sp.) 是随植株树龄增大、叶龄老化发病率显著降低。橡胶白粉病 (*Oidium vere*)、燕麦白粉病 (*Erysiphe graminis*)、桃白粉病 (*Sphaerotheca pannosa*) 也有类似的报道^{[1][8][15]}。植物对一些真菌病害的抗性早期研究中, Bassett (1911) 曾指出,较抗病的果实常具有高的氧化酶活性^[7]。Рубин (1952) 证实棉花品种抗病的比感病的多酚氧化酶活性高^[5]。Sridhar (1974) 认为抗坏血酸氧化酶活性降低是稻瘟病感病性增高原因之一。沈其益 (1978) 报道棉花枯萎病感病的与抗病的品种间过氧化物酶同功酶活性是不同的^[2]。Рашевская 在研究小麦叶片对锈菌的抗性时观察到叶片末端比基部更有利于病菌侵入和孢子堆形成是与过氧化氢酶活性有关^[6]。显然,植物品种或植株的不同器官之间酶的生理反应对某些病害具有一定的保护特性,植物白粉病寄主的品种或不同发育阶段表现的感病性与抗病性一般认为与植物的形态结构^{[10][11][12]}、抗生植物^{[9][10][12]}相联系,与酶活性的关系尚少见报道。本文通过比较大叶相思不同叶龄发育阶段的抗坏血酸氧化酶、多酚氧化酶、过氧化物酶同功酶的生理反应探讨植株叶片组织中这些酶类变化与白粉病发生的关系。

材 料 和 方 法

试验材料: 1981~1984年的3~6月大叶相思白粉病严重发病期间在华南农业大学、广东省林科所苗圃和造林地的二、五、十七年生的大叶相思,进行物候观察、叶片解

本文承蒙李子超教授,王庄教授,蔡耀垣讲师审阅,徐声杰讲师、胡仲强、赵备成同志参加部分试验工作,特此致谢。

剖结构和接种试验。接种体是用新鲜感病的大叶相思斑块（大小 $1 \times 2 \text{ mm}$ ，孢子含量约为 10^5 个孢子。）接种时将斑块粘贴于寄主上，用塑料袋保湿24小时，观察记录菌丝体，孢子量和叶片褪色程度，计算发病率。根据上述观察和试验的结果，选取1~15天叶龄为高度感病叶片和30天以上叶龄为高度抗病叶片作三种酶活性的测试材料。

抗坏血酸氧化酶和多酚氧化酶活性用常规法测定：摘取高感和高抗叶片后即置于冰壶中。测试时各称取2克试样，加经冷冻的pH6磷酸缓冲液，迅速研磨成浆，稀释后放在 $18 \sim 20^\circ\text{C}$ 水浴锅上浸提30分钟，离心取得酶浸提液，然后加入定量的抗坏血酸或焦儿茶酚底物，以0.005M碘液滴定测定酶活性。

过氧化物酶同功酶的测定：材料取样与抗坏血酸氧化酶测定法同。将供试叶片洗净擦干，称取5克剪碎，放在预冷的研钵中，加入0.1M pH0.8的Tris-HCl缓冲液，研磨成匀浆，经四层纱布过滤，取滤液在冰箱内 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 下以3500转/分离心20分钟，将上清液作酶分析。同功酶的分离用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳^[3]，凝胶系统为7%，电极缓冲液pH8.9，电流2~3毫安，电泳时间60~80分钟。用抗坏血酸—联苯胺染色，记录酶谱数和色深。同时还使用日产岛津紫外光层析扫描仪，（Shimadzu Wavelength TIC Scanner CS—910）吸收波长为600nm，扫描速度20nm/min进行酶带扫描。

结 果

（一）大叶相思叶龄抗病性的差异

对二、五年生的大叶相思不同叶龄进行白粉菌接种试验，每次各叶龄接种30个叶片，重复5次，25天后记录发病情况，计算平均发病指数结果如图1。

图1看出大叶相思白粉病的发病率是随树龄增大、叶片老化而降低，这与自然感病情况调查材料是一致的。根据植物对白粉菌抗性主要表现为不同的病斑型，我们把1~15天叶龄划为高度感病叶龄，30天以上为高度抗病或近乎免疫叶龄。高感叶片黄白至浅绿色，角质层厚度 $1.1 \sim 2.7$ 微米。高抗叶片浓绿色角质层厚 $4.5 \sim 6.9$ 微米。

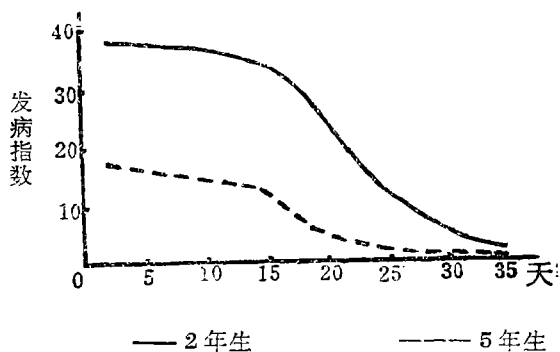


图1 二、五年生大叶相思不同叶龄接种白粉菌的发病指数

（二）大叶相思高感叶龄与高抗叶龄的抗坏血酸氧化酶和多酚氧化酶活性比较

1. 大叶相思三个树龄叶片两种酶活性比较：两种酶活性测定是在1982~1983年的4~6月进行的，气温在 $22 \sim 28^\circ\text{C}$ 间。每次测量15~20株，重复6次，酶活性以每克鲜组织每分钟氧化抗坏血酸的毫克数表示。由于温度影响酶的活性（图2），但在测量温度范围内，酶活性变化的规律基本上是一致的。我们取 $26.5 \sim 28.2^\circ\text{C}$ 间的测量结果值，如表1，并对树龄（A）、叶龄（B）与抗坏血酸氧化酶活性的关系用双因素有重复的方差分析，进行显著性检验。

表中看出,大叶相思三个龄级的叶片抗坏血酸氧化酶活性老龄树大于幼龄树,高度抗病的老龄叶大于高度感病的幼龄叶,同时还看到叶龄酶活性有随树龄增大而提高的趋势。这种差异用双因素有重复的F检验的结果是: $F_A = 15.12^{**} > F_{0.01} = 6.93$, $F_B = 167.13^{**} > F_{0.01} = 9.33$, $F_{A \cdot B} = 6.07^* > F_{0.05} = 3.89$,说明差异是极显著的。相关分析还表明,高感病叶和高抗病叶的抗坏血酸氧化酶活性与接种发病率有显著的相关关系($r = -0.8260 > r_{0.01} = 0.7079$)。多酚氧化酶活性大叶相思高感病叶稍高于高抗病叶,但差异不显著($t_{0.05, 2.57} > 1.08$)。酶活性受到温度的影响,每种酶只有在一定的温度下才表现其最大的活力,两种酶测定期间的温度是在22~28℃之间。我们测定了这个温度范围与酶活性的关系,发现抗坏血酸氧化酶、多酚氧化酶活性与温度成反比例。感病叶和抗病叶的抗坏血酸氧化酶变化系数较少,分别为33.66和19.71,而多酚氧化酶较大,为82.28和54.25。

2. 补充抗坏血酸对大叶相思感染白粉菌和抗坏血酸氧化酶活性的影响:1983~1984年对造林地的大叶相思二年生苗的高感叶龄在接种前24小时和接种出现白色菌层后使用每升含10、25、50毫克的抗坏血

酸进行喷洒处理,对照用清水。前者喷药1次,后者隔天1次,连续3次。每一处理接种30片叶,重复5次。21天后测定白色粉层和病斑面积。不接种喷药(10mg/升),对照清水,分别在24小时和48小时后测定抗坏血酸氧化酶活性,结果如表2。

试验结果表明,接种前后喷洒抗坏血酸不能完全阻止白粉菌的侵入和病害扩展,却能使色斑从黄转绿,病斑变小,抑制了叶肉细胞变褐。接种后连续喷药病斑的扩展明显比对照小,尤其以10mg/升效果最好。这与Toyoda(1978)报道感染白粉病的大麦叶片由于补充抗坏血酸而抑制过敏性坏死^[14]的结论是一致的。补充抗坏血酸24小时后叶片抗坏血酸氧化酶活性提高1.3倍,看来酶活性的提高与抑制白粉菌发育是有一定关系的。

(三) 大叶相思感病叶龄与抗病叶龄的过氧化物酶同功酶比较

我们测定了二年生大叶相思接种出现症状叶片以及二、七、十七年生的不接种叶片的

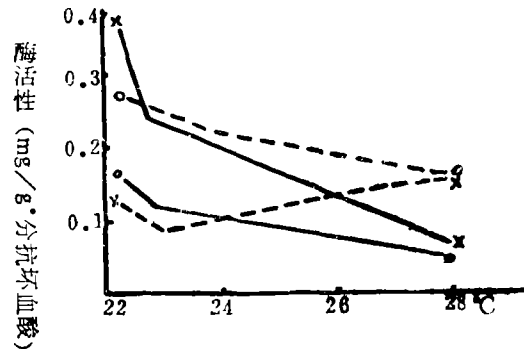


图2 大叶相思叶片两种酶活性温度变化曲线
○—○ 嫩叶抗坏血酸氧化酶 ○---○ 老叶抗坏血酸氧化酶; x—x 嫩叶多酚氧化酶 x---x 老叶多酚氧化酶

表1 大叶相思叶片抗坏血酸氧化酶、多酚氧化酶活性比较 (mg/g.分抗坏血酸)

树 木	抗坏血酸氧化酶		多酚氧化酶	
	不接种	接种	不接种	接种
二年生 高感叶龄	0.1002	0.0740	0.2105	0.1340
二年生 高抗叶龄	0.2176	0.2879	0.1536	0.1140
七年生 高感叶龄	0.1226	0.0780	0.2081	0.1458
七年生 高抗叶龄	0.2926	0.3087	0.1559	0.1441
十七年生 高感叶龄	0.1333	-	0.2110	-
十七年生 高抗叶龄	0.3632	-	0.1642	-

过氧化物酶同工酶。结果发现，接种感病叶片同工酶谱比对照增加2条颜色较浅酶带，而抗病叶片并无增加（图3）。不接种的二、七、十七年生的大叶相思叶片同工酶谱（图4）中三个龄级的大叶相思感病叶片和抗病叶片各条酶带从阴极向阳极的迁移顺序，大致可分PX—I、PX—II和PX—III三个活性区，每区的各条酶带按迁移顺序依次编号。二年生的大叶相思抗病叶与感病叶比较，在PX—I区的I₁增加2条PX—I₁'酶带。七年生的抗病叶与感病叶片比较，在PX—I区的I₁酶带的阳极端增加了1条PX—I₁'酶带，另一酶带染色强度很深。十七年生抗病叶在PX—I区的I₁酶带和I₂酶带各增加了PX—I₁'和PX—I₂'酶带，在PX—II的II₁还增加了PX—II₁'酶带，但着色强度较浅。扫描（图5）图上相应区间的主峰位置、宽度、峰高与上述谱型基本相似。可以看出，感病叶片与抗病叶片之间的差异主要表现酶带数目的不同，而且酶带数还随树木年龄而增多，增加的酶带主要分布在PX—I区。

表2 大叶相思叶片补充抗坏血酸后对白粉菌侵染斑和抗坏血酸氧化酶活性的影响

处 理 时 间	病 斑 面 积 (mm ²)			
	对照	10mg/升	25mg/升	50mg/升
接种24小时前喷药	23.10	16.10	18.30	19.30
接种后喷药三次	22.90	11.23	16.20	15.80
抗坏血酸氧化酶活性 (mg/g. 分抗坏血酸)				
喷药 24小时后			0.2430	
48小时后			0.1835	
对照			0.1137	

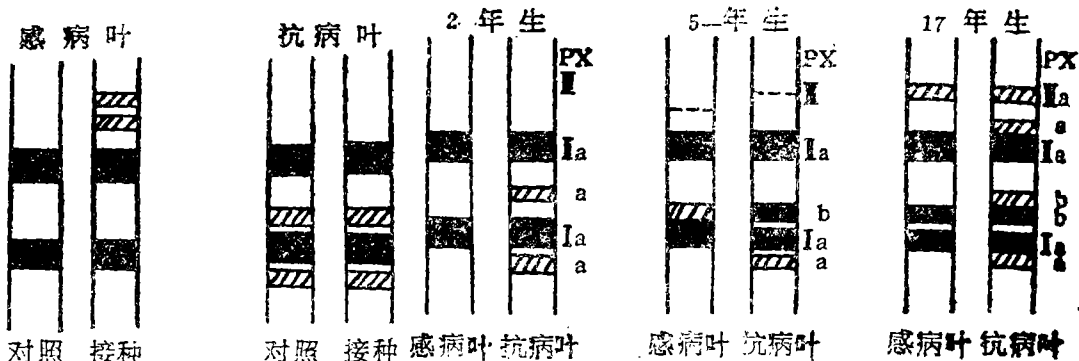


图3 大叶相思叶片接种后过氧化物酶同工酶变化

图4 不同龄大叶相思叶片过氧化物酶同工酶酶谱比较

讨 论

一般认为^{[2][5][7]},植物的氧化酶活性与某些真菌病害的抗病性有关。补充抗坏血酸可以抑制过敏性坏死^[15]和使黄化斑叶片转绿^[16]。我们对大叶相思白粉病的测试研究也证实了这一点。植株补充抗坏血酸24小时后测定叶片的抗坏血酸氧化酶活性提高到接近老叶水平,可能是喷洒抗坏血酸引起植物体内酶促反应,激发抗坏血酸氧化酶活性的提高,从而对白粉菌的侵染扩展起一定的抑制作用。

大叶相思幼苗接种白粉菌后感病叶片过氧化物酶同功酶活性反应增强,而抗病叶片反应较小,这与前人报道三叶草白粉病(*Erysiphe polygoni*)^[13],棉花枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. *vasinectum*)^[12]的感病和抗病品种间的变化相类似。

苗期大叶相思对白粉菌高度感病,其后随年龄增大而发病率降低,由此看来树木叶片同功酶活性与感病性是呈负相关的。也许是过氧化物酶同功酶某些特殊同功酶成份与植物的抗性相联系。

根据接种大叶相思叶片抗坏血酸氧化酶和过氧化物酶同功酶活性的反应,结合对高感叶龄和高抗叶龄在一定条件下测量获得的抗坏血酸氧化酶、过氧化物酶同功酶活性恒定值作为指标,这对选育抗病品种是有一定参考价值的。

植物中叶片酶活性对某些真菌的反应可能是不同的,棉花品种抗病的比感病的多酚氧化酶活性高^[5],而大叶相思抗病叶的多酚氧化酶活性却低于感病叶,也许是褐化反应对抑制大叶相思白粉菌的发育不起主导作用,亦即是说酚类化合物的氧化作用在抑制大叶相思白粉菌发育中的作用不显著。

本文从试验结果着重比较了大叶相思感病叶龄与抗病叶龄的抗坏血酸氧化酶、过氧化物酶同功酶活性间的差异,分析其与抗性的关系,并不排除植株叶片表现的感病性与抗病性可能与其他的酶类,抗生物物质、形态结构等多种因素综合影响有关。

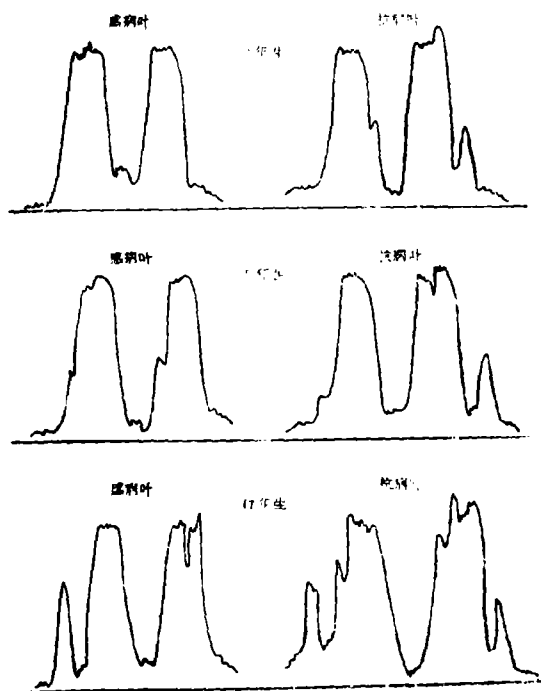


图5 不同龄大叶相思叶片过氧化物酶同功酶谱扫描

参 考 文 献

- [1] 华南热带作物学院热带植物保护系: 热带作物病虫害防治(上篇), 36, 农业出版社, 1978年。
- [2] 沈其益、阎龙飞、李庆荃、张元恩、腾晓月、李筠仪、王正芬、傅翠员: 棉花感染枯萎病后过氧化物酶同功酶的变化, 《植物学报》, (20) 1978, : 108—113。
- [3] 莽克强、徐乃正、方荣祥: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 科学出版社, 1975年。
- [4] 梅镇安、方昭常、袁晓华: 抗坏血酸对大豆 (*Glycine max* Xerrill) 黄化幼苗子叶转绿的影响 《植物学报》(2) 1964: 157—165。
- [5] Б. А. 鲁宾 (Б. А. Рубин), Е. В. 阿尔剂霍夫斯卡娅 (Е. В. Арихновская), 氧化系统和植物免疫性, 《植物病理学》译版, (2) 1956: 83—93
- [6] В. Ф. 拉雪芙斯卡亚 (В. Ф. Рашевская), 过氧化氢酶的活动力对于小麦感染叶锈病时抵抗力的影响, 《植物病理学》译报, (3) 1956: 202—205。
- [7] Bassett H. P. & Thompson F. 1911. The preparation and properties of an oxidase occurring in fruit Jour. Amer. Chem. Soc. 33, 416-423.
- [8] Hite, R. E., Sherwood, R. T. and Marshall, H. G. 1977 Adult plant resistance to powdery mildew in "DAL" oats Plant Disease reporter 61: 273-277.
- [9] Martin, J. T., Batt, R. F. and Burchill, R. T. 1957. Defence mechanism of plant against fungi. Nature. 180, 796-797.
- [10] Perjes, O. S. 1962. Studies on strawberry mildew caused by *Sphaerotheca macularis* (Wallr ex Fries) Jaczewski. Ann. app. Biol. 50, 225-233.
- [11] Schnathorst, W. O. 1959. Resistance in lettuce to powdery mildew related to osmotic value. Phytopathology 49, 562-571.
- [12] Staub, T., Dahmen, H. and Schwinn, F. J. 1974. Light-and scanning electron microscopy of cucumber and barley powdery mildew on host and nonhost plant. Phytopathology 64, 364-372.
- [13] Stareley, J. K. and Hanson, E. W. 1967. Electrophoretic comparison of resistant and susceptible *Trifolium pratense* noninoculated and inoculated with *Erysiphe polygoni* Phytopathology. 57, 482-485.
- [14] Toyoda, H., Shigeyuki, M. and Jiko, S. 1978. Inhibition of hypersensitive necrosis by ascorbic acid supply in powdery-mildewed barley leaves. Ann. Phytopath Soc Japan 44. 525-527.
- [15] Weinhold, A. R. and English, H. 1964. Significance of morphological barriers and osmotic pressure in resistance of mature peach leaves to powdery mildew. Phytopathology 54, 1409-1411.

A COMPARISON STUDY ON THE ACTIVITIES OF THREE
ENZYMES IN THE LEAVES OF *ACACIA AURICULIFORMIS*
SUSCEPTIBLE AND RESISTANT TO *OIDIUM SP.*

Cen Bingzhun Hwang Lifang Zheng Huiqin

(Department of Forestry)

ABSTRACT

The biochemistry test in the susceptibilities of the leaves of *Acacia auriculiformis* to the pathogen, *Oidium* sp. was made. The result showed that the activities of ascorbic acid oxidase and peroxidase isoenzyme increased with the three tree age groups and were higher in the old and resistant leaves than in the young and susceptible leaves. The application of ascorbic acid to the leaves which had been infected by the pathogen could turn them green and put off the spread of the lesions. After the application for 24 hours the activity of ascorbic acid oxidase in the young and susceptible leaves increased obviously. There was a correlation between the activities of these two enzymes in the leaves and the plant resistance.