

氮营养对菜心炭疽病抗性生理的影响

I. 氮营养对菜心炭疽病及细胞保护酶的影响

杨 暹, 陈晓燕, 冯红贤

(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:研究了 6 种不同氮营养水平下炭疽病菌对菜心叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响及其与抗病性的关系。结果表明,适宜的氮营养处理(N_3 处理)可提高植株的耐病能力,病情指数降低。氮营养对植株细胞保护酶系统有明显的影响,炭疽病菌对 SOD、POD、CAT 活性有明显的诱导调节作用。接种后,适宜氮营养比高氮、低氮或不施肥可加强炭疽病菌对 POD 活性的诱导和抑制炭疽病菌在前期对 SOD 活性的诱导,但在后期则加强了对 SOD 活性的诱导。不同氮营养下炭疽病菌对 CAT 的诱导调控作用不同,不施肥或较高的氮营养在致病过程中都显著地提高 CAT 活性,但适宜氮营养下只是前期具有明显的促进作用,后期逐渐转化为抑制作用。

关键词:菜心; 氮营养; 诱导接种; 炭疽病; 细胞保护酶

中图分类号:S634.5

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)02-0026-05

The effects of nitrogen nutrition and inoculation with *Colletotrichum higginsianum* on anthracnose resistance physiology in Flowering Chinese Cabbage

I. The effects of nitrogen nutrition on anthracnose and cell protective enzymes in Flowering Chinese Cabbage

YANG Xian, CHEN Xiao-yan, FENG Hong-xian

(College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effects of six of nitrogen(N) treatments and inoculation with *Colletotrichum higginsianum* on the activities of superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD) and Catalase(CAT) and incidence of anthracnose were studied in Flowering Chinese Cabbage (*Brassica parachinensis*). The results showed that suitable N treatment (N_3) could enhance the disease tolerance and decreased the disease index. N nutrition had obvious effect on cell-protecting enzymes system and anthrax fungi had obvious regulative effect on the activity of SOD、POD and CAT. Compared with high, low N levels and non-fertilization treatment, suitable N level could strengthen POD activity, inhibited SOD activity in the earlier stage after inoculation, but increased in the later stage. Anthrax fungi in different N levels on CAT activity had different induction and regulation effects. High N and non-fertilization treatment significantly increased CAT activity in pathogenic process, but suitable N had obvious promotive effect in the early stage and gradually changed into inhibition effect in the later stage of inoculation.

Key words: *Brassica parachinensis*; nitrogen nutrition; inoculation; anthracnose; cell protective enzymes

菜心 *Brassica parachinensis* 是我国特产蔬菜,周年生产,为华南地区栽培规模最大的蔬菜之一。近年来,由于蔬菜基地化、专业化的发展及产业化程度的提高,菜心的复种指数越来越高(1年内连作6~7茬),引起菜田生态环境恶化、蔬菜病虫害严重、产量降低、品质恶化等一系列不良现象。炭疽病的发生越来越严重,每年4~10月发生比较普遍,病情指数可达50~80,严重影响了菜心的产量与品质,严重者损失可达30%~40%^[1]。为了提高产量,种植者增加了化肥的施用量、农药的使用量和频率,违章使用农药和滥施化肥的现象十分严重,由此增加了土壤的污染,破坏了生态平衡,食品安全受到严重威胁。关于矿质营养与植物病害的关系及其机理正日益受到国内外的重视^[2]。业已证明,氮营养与菜心生长发育的关系最为密切^[3],但氮素的施用一般会减弱植物的抗病性,发病率增加,病害程度加重^[4~7],但有关抗病机理的研究尚薄弱。本文通过不同的氮营养水平处理,探讨氮营养与菜心炭疽病及细胞保护酶的活性,通过合理施用氮肥调控菜心抗病能力,为减少菜心炭疽病的发生提供一条新的生物学途径。

1 材料与方法

1.1 材料

以“四九·油青”菜心品种为材料,于7~9月在华南农业大学蔬菜试验基地进行。

1.2 处理

1.2.1 氮营养处理 取晒干敲碎的塘泥与细沙以5:3(V/V)混合,用福尔马林灭菌后为培养基质。于7月8日温室下盆栽直播,盆的规格为口径27 cm、高16 cm。试验设置 N_0 、 N_1 、 N_3 、 N_5 、 N_7 、 N_9 [N下标数字表示每株菜心整个生育期尿素施用的质量(g)]6个处理。每处理12盆,每盆栽植6株,每处理3次重复。播种前,把各处理总肥量的15%为基肥,其余肥量于接种前每隔4 d分7次追肥完毕,肥量分别为5%、10%、10%、15%、15%、15%、15%。培养基质的养分状况是:有机质2.38%,全氮0.27%,有效磷36.6 mg/kg,有效钾151.7 mg/kg, pH 5.2。

1.2.2 炭疽病接种 8月7日菜薹形成初期,采用人工喷雾接种法,用小型手持喷雾器将孢子数量为 $8 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ 的菜心炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum* 的孢子悬浮液喷洒在各处理植株叶片表面上,以叶面布满小水珠但不下滴为度,接种后用塑料薄膜闷盖保湿24 h。所有处理在同样条件下以喷无

菌水为对照。

1.3 测定方法

1.3.1 病情指数的测定 于接种后6 d,参照张华等^[1]的病情分级标准,统计病情指数。0级:叶片无症状(级值为0);1级:叶片上只有少数几个病斑(级值为1);2级:病斑面积占叶面积的10%以下(级值为3);3级:病斑面积占叶面积的10%~25%(级值为5);4级:病斑面积占叶面积的25%~50%(级值为7);5级:病斑面积占叶面积的50%以上(级值为9)。

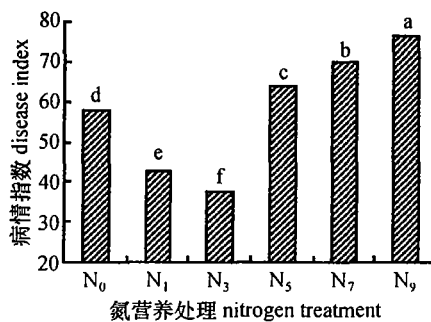
$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级叶片数} \times \text{级值数})}{\text{调查总叶片数} \times \text{最高级值数}} \times 100.$$

1.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的测定 参照杨暹^[8]等的方法,于接种后0、2、4、6、8 d,分别取叶片测定。

2 结果与分析

2.1 氮营养对菜心炭疽病抗性的影响

由图1可见,氮营养对植株叶片炭疽病的发生具有明显的影响。处理中,以 N_9 处理的病情指数最高, N_3 处理最低,其他处理居两者之间。处理间,病情指数的顺序为: $N_9 > N_7 > N_5 > N_0 > N_1 > N_3$,且各处理间差异达显著水平。这表明氮营养与菜心炭疽病的发生有密切的关系,适宜的氮营养有利于提高植株对炭疽病的抗性,植株耐病能力提高,病情指数降低;而过高、过低的氮营养或不施肥,特别是高氮水平下更有利于炭疽病的发生,植株病情指数提高。



方柱上方不同字母示 Duncan's 检验($P=0.05$)差异显著
Duncan's test, different letters over the histogram are significantly different at 0.05 level.

图1 氮营养对菜心炭疽病抗性的影响

Fig. 1 Effects of nitrogen nutrition and inoculation with anthracnose on disease index in Flowering Chinese Cabbage

2.2 对叶片 SOD 活性的影响

由图2可知,在未接种的植株叶片中,不同氮营养处理叶片的 SOD 活性变化规律不同, N_0 、 N_5 处理出现先升后降再升的变化, N_1 处理先上升后降低, N_3

处理呈“M”字形变化, N_7 处理一直持续缓慢上升, 而 N_9 处理呈现先降低后上升再降低的现象. 在接种植株叶片的致病过程中, 不同氮营养处理叶片 SOD 活性也是不同的, 彼此消长也有差异. 在致病过程中, N_0 、 N_3 处理的叶片 SOD 活性呈现先上升后降低再上升的变化, N_1 、 N_9 处理先上升后下降, N_5 、 N_7 处理呈现上升—下降—上升—下降的现象, 但各处理的 SOD 活性出现高峰值的时间也不尽相同, 其中 N_0 、 N_3 处理 SOD 活性在接种后 8 d 达到高峰值, N_1 、 N_5 、 N_7 、 N_9 处理接种后 6 d 达到高峰值. 而各处理出现低谷的时间也不尽相同.

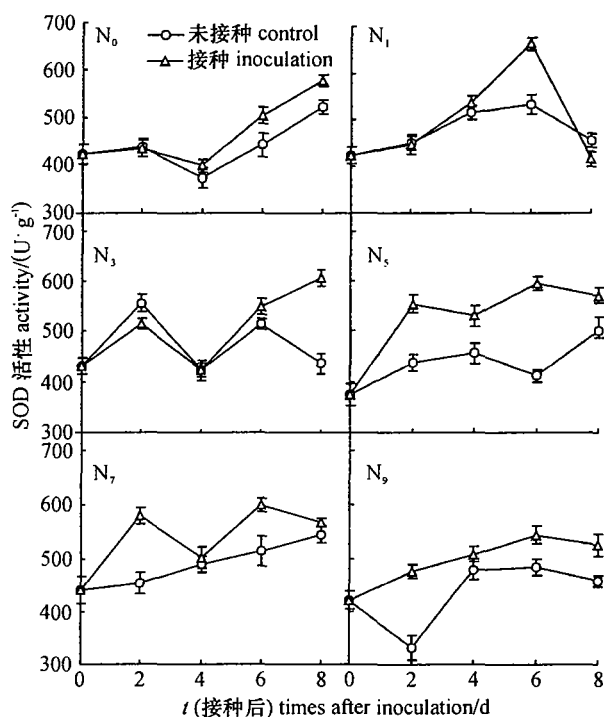


图2 不同氮养下炭疽病对菜心叶片 SOD 活性的影响
Fig. 2 The effect of anthracnose on SOD activity of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese Cabbage

同一氮营养处理接种叶片与其未接种的对照相比, 除 N_3 处理在接种后 4 d 内, 叶片 SOD 活性比对照有所下降外, 其他处理在接种后的致病过程中, 叶片 SOD 活性基本上比对照高, 且高氮处理比低氮处理的增加幅度大. 在接种后的 4 d 中, N_0 、 N_1 、 N_3 处理的接种植株叶片的 SOD 活性与相对应的对照之间的差异不明显, 在接种后的 4~8 d 内的差异有所增加; 而 N_5 、 N_7 、 N_9 处理的在接种后的 0~8 d 内, 接种植株与对照的叶片 SOD 活性一直保持较大的差异. 表明, 氮营养可影响 SOD 活性, 炭疽病菌可诱导 SOD 活性的增加, 而高氮营养与低氮营养相比, 更能提早与加强炭疽病菌对 SOD 活性的诱导作用.

2.3 对叶片 POD 活性的影响

由图 3 可知, 在未接种的植株叶片中, 所有氮营养处理的 POD 活性在生长过程中变化平缓, 没有明显的升降现象. 在接种的植株叶片中, 所有氮营养处理的 POD 活性呈现上升—下降的单峰曲线变化的现象, 但彼此消长有所差异, N_0 、 N_5 、 N_7 、 N_9 处理的 POD 活性的变化规律相似, 即接种后 2 d POD 活性略有上升, 接种后 2~6 d POD 活性明显上升, 并于接种后 6 d 达到最高值, 此后逐渐下降; N_1 、 N_3 处理的 POD 活性的变化规律相似, 即接种后 2 d POD 活性略有上升, 接种后 2~4 d 急剧升高, 第 4 d 达到峰值后逐渐下降. 所有处理的接种植株叶片 POD 活性均比各自未接种的对照高, 且接种叶片的 POD 活性达到峰值时比各自对照分别增加 4.5、6.5、7.8、4.5、4.1、3.8 倍. 说明 N_1 、 N_3 处理在诱导接种后, 叶片 POD 活性上升快, 增幅大; 而 N_0 、 N_5 、 N_7 、 N_9 叶片 POD 活性上升慢, 增幅小. 可见适宜氮营养比不施肥或高氮营养可促进炭疽病菌对 POD 活性的诱导作用.

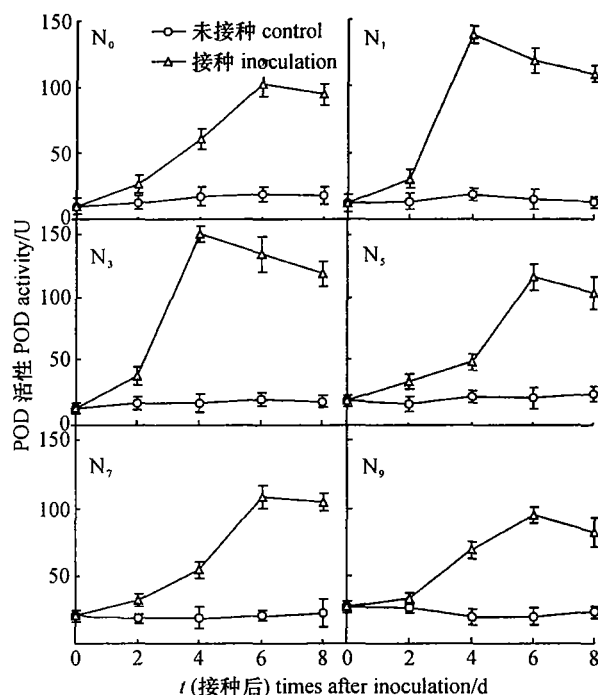


图3 不同氮营养下炭疽病对菜心叶片 POD 活性的影响
Fig. 3 The effect of anthracnose on POD activity of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese Cabbage

2.4 对叶片 CAT 活性的影响

由图 4 可知, 在未接种的植株叶片中, 氮营养水平不同, CAT 活性的消长也不同, N_0 、 N_1 、 N_5 处理的 CAT 活性先升高后下降再升高; N_3 处理的 CAT 活性持续上升; N_7 处理的 CAT 活性先下降后上升; N_9 处理的 CAT 活性前期变化小, 后期先降低后又上升.

在接种的植株叶片中,所有氮营养处理的 CAT 活性的变化规律基本一致,即先急剧增加后逐渐下降,峰值基本上在接种后第 2 d 出现. 同一处理接种叶片与其对照相比, N_0 、 N_5 、 N_7 、 N_9 处理接种后叶片 CAT 活性均高于各自对照,但于接种后 8 d 基本与对照持平; N_1 、 N_3 处理接种后叶片 CAT 活性在前 6 d 高于各自对照,接种 6 d 后逐渐低于对照. 可见,氮营养可影响植株叶片的 CAT 活性,炭疽病菌对 CAT 有明显的诱导调节作用,但不同氮营养处理的诱导调控作用不同,不施肥或较高的氮营养在致病过程中都显著地诱导 CAT 活性的提高,但适宜氮营养下只是前期具有明显的诱导作用,后期逐渐转化为抑制作用.

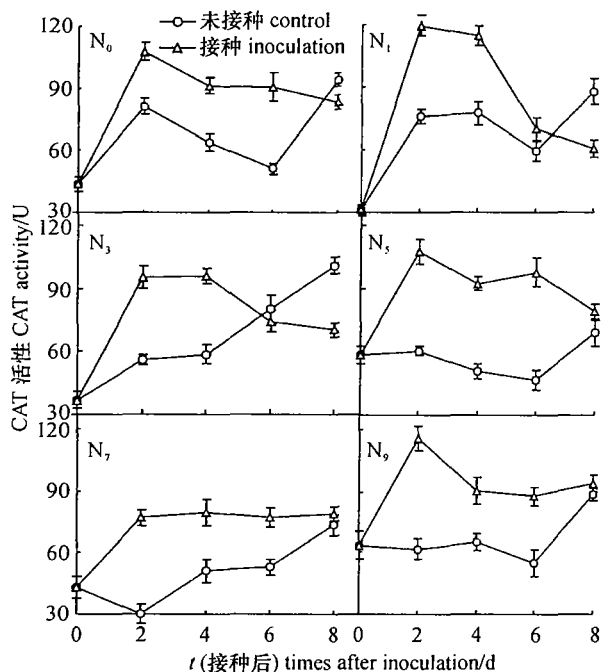


图4 不同氮营养下炭疽病对菜心叶片 CAT 活性的影响

Fig.4 The effect of anthracnose on CAT activity of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese cabbage

3 讨论

本试验结果表明,氮营养与菜心炭疽病的发生有密切关系,适宜的氮营养(N_3 处理)有利于提高植株对炭疽病的抗性,植株耐病能力提高,病情指数降低;而过高、过低的氮营养或不施肥,特别是高氮水平下更有利于诱导炭疽病的发生,植株病情指数提高. 因此,为防止菜心炭疽病的发生,生产上必须避免偏施氮肥.

作物被病原菌感染时最快速的反应之一是瞬间活性氧大量产生和积累,这种现象称为氧化猝发或氧化跃变(oxidative burst),但活性氧对作物会造成

一定的伤害. SOD、POD、CAT 是主要的活性氧清除酶类. SOD 能快速催化超氧阴离子进行歧化反应生成 H_2O_2 和氧. H_2O_2 需立即清除,否则在 Fe^{3+} 螯合物的存在下, H_2O_2 易与 O_2 进行 Fenton 型 Haber-weiss 反应产生羟自由基,后者对生物体的毒性比 H_2O_2 更强,它能直接攻击膜脂不饱和脂肪酸导致过氧化链式反应而破坏膜的正常功能^[9]. 超氧阴离子、 H_2O_2 和羟自由基都是活性氧(AOS). H_2O_2 的清除酶有 CAT 和 POD 等. 需氧生物体内存在着一个以 SOD 为核心, CAT 和 POD 等协同作用的活性氧清除酶系统. 在正常的生长条件下, AOS 不断产生,同时也不不断地被清除,植株体内处于动态平衡,因而不会对生物体造成损害. 病原物作为一种特殊的胁迫因子,使植物应激产生大量的超氧阴离子自由基,从而诱发了 SOD 等保护酶系的活性,同时胁迫又破坏了以 SOD 为主导的细胞保护系统,而导致后来的酶活性下降,植物则表现出伤害或病状^[10]. SOD 活性的增加必然会造成 H_2O_2 的积累,而 POD、CAT 活性增加是适应体内 H_2O_2 积累的自我调节^[11],减轻植株的伤害.

有研究表明,在黄瓜感染霜霉病后,感病品种比抗病品种表现出较高的 SOD、CAT 和 POD 活性,可能是 3 种酶在清除 AOS 的协同作用,以便更有效地清除 AOS 对膜的破坏,从而保护细胞的分室效应,有利于维持霜霉病菌的活体营养寄生关系^[9]. 小麦抗锈病品种抽穗期叶片中 SOD 和 CAT 活性较低,超氧阴离子自由基产生速率较高^[12]. 在水稻上的研究结果表明了水稻幼苗产生的活性氧可能启动了膜脂过氧化,由此引起过敏反应(HR)中的细胞死亡而在抗稻瘟病中起作用^[13]. 在本试验中,将适宜氮营养处理与高水平或低水平氮营养处理进行比较,可以发现:在接种后的初期,适宜氮营养处理的 SOD 活性的增加速度较慢,甚至比对照还略有下降,超氧阴离子的积累相对较多,能较早地催化细胞膜中的不饱和脂肪酸而启动膜脂过氧化,导致细胞死亡,产生坏死斑,细胞膜透性增加的幅度较小,而同时 POD、CAT 活性增加得较快,这样,体内保持较低含量的 H_2O_2 可以作为一种信号分子在菜心炭疽病的反应中诱导抗病性的产生. 在接种后期,适宜氮营养处理的植株仍保持较高水平的 SOD、POD 活性,使得自由基等活性氧与其清除系统之间能保持相对的平衡,抗性较强,发病较轻,病情指数较低. 而高水平或低水平氮营养处理在接种后的初期就存在着较高含量的

H_2O_2 ,较高含量的 H_2O_2 会抑制对抗病性的诱导;在接种的后期,过量超氧阴离子自由基的积累非但不能起到积极抗病的作用,反而会对植物体造成伤害,导致脂质过氧化作用的加剧,膜结构遭到的破坏非常严重,细胞膜透性明显增加,这些都有利于病原菌的扩展,加重病害的发生,甚至死亡.总之,适宜氮营养在早期就产生了一种类似于过敏性坏死反应的防御机制,能及早地限制病情的进一步扩展.由此可见,在适宜氮营养处理的植株对炭疽病菌侵染的早期抗病诱导调控中,活性氧的增加、脂质过氧化的出现存在着明显的时序性:植株识别病原后,体内产生活性氧,由此积累的活性氧导致膜脂过氧化的加剧,从而引起植物产生类似于过敏性反应的细胞死亡而产生抗性.而高水平或低水平氮营养处理的植株引起的膜脂过氧化较迟较弱,未能及时发生类似于过敏性反应的细胞坏死,只是产生后期感病反应的细胞死亡.可见,诱导接种后,适宜氮营养可有效地调控植株细胞活性氧代谢平衡体系,减缓了病害的进一步发展.

参考文献:

- [1] 张 华,周而勋,刘自殊,等.菜心炭疽病苗期抗病性鉴定技术[J].华南农业大学学报,1998,19(3):47-50.
- [2] SHARMA S R, KOLTE S J. Effect of soil-applied NPK fertilizers on severity of black spot disease (*Alternaria brassicae*) and yield of oilseed rape[J]. Plant and Soil, 1994, 167: 313-320.
- [3] 关佩聪.菜心栽培生理研究进展[J].长江蔬菜,1987,16(4):1-5.
- [4] 何绍国,秦焯南,李成秀.氮磷钾水平对柠檬产量和流胶病的影响[J].西南农业大学学报,1996,18(1):13-16.
- [5] 冯荣扬,郭良珍.甘蔗品种、施氮水平对甘蔗赤斑病严重程度及产量损失的影响[J].热带作物学报,2000,21(2):80-85.
- [6] LEITCH M H, JENKINS P D. Influence of nitrogen on the development of *Septoria epidemics* in winter wheat[J]. J Agri Sci, 1995, 124: 361-368.
- [7] FIDANZA M A, DERNOEDEN P H. Interaction of nitrogen source application timing and fungicide on *Rhizoctonia blight* in ryegrass[J]. Hort Sci, 1996, 31(3): 389-392.
- [8] 杨 暹,陈晓燕,刘志才.硼钼营养对青花菜产量及活性氧代谢的影响[J].园艺学报,2000,27(2):112-116.
- [9] 潘汝谦,黄旭明,古希昕.活性氧清除酶类在黄瓜感染霜霉病过程中的活性变化[J].植物病理学报,1999,29(3):287-288.
- [10] 王爱国.植物生理与分子生物学[M].北京:科学出版社,1998.366-389.
- [11] 李兆亮,原永兵,刘成连,等.水杨酸对黄瓜叶片抗氧化剂酶系的调节作用[J].植物学报,1998,40(4):356-361.
- [12] 李兰真,赵会杰,杨会武,等.小麦锈病与活性氧代谢的关系[J].植物生理学通讯,1999,35(2):115-117.
- [13] 葛秀春,宋凤鸣,郑 重.稻瘟菌侵染后水稻幼苗活性氧的产生与抗病性的关系[J].植物生理学报,2000,26(3):227-231.

【责任编辑 柴 焰】