

氮营养对菜心炭疽病抗性生理的影响

II. 氮营养对菜心炭疽病及膜脂过氧化作用的影响

陈晓燕, 杨 暹, 张璐璐

(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细胞膜透性、多酚氧化酶(PPO)活性、抗坏血酸(AsA)和丙二醛(MDA)含量的影响及其与抗病性的关系。结果表明,炭疽病菌可促进叶片 AsA 的降解,低氮比高氮处理的促进作用更明显。炭疽病菌感染后可促进叶片 PPO 活性的提高,适宜的氮营养(N₃处理)比不施肥、低氮或过高氮营养可明显地加强炭疽病菌对 PPO 的诱导作用。所有氮营养处理的植株叶片的细胞膜完整性在受炭疽病菌侵染后,逐步遭到破坏,膜透性明显增加,但适宜氮营养比不施肥和高氮营养处理的细胞膜受炭疽病菌的破坏作用小。随着炭疽病菌感染时间的延长,叶片 MDA 含量持续上升,表明植株受到炭疽病菌侵染后,脂质过氧化产物增加,脂质过氧化作用加强。经炭疽病菌侵染后,低氮和适宜氮营养(N₃处理)早期会加速膜脂过氧化水平,但后期对脂质过氧化作用有所抑制,而不施肥或高氮水平下的作用效应正好相反。

关键词:菜心;氮营养;诱导接种;炭疽病;膜脂过氧化作用

中图分类号:S634.5

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)03-0001-05

Effects of nitrogen nutrition and inoculation with *Colletotrichum higginsianum*

on anthracnose resistance physiology in Flowering Chinese Cabbage

II. The effects of nitrogen nutrition on anthracnose and membrane lipid peroxidation in Flowering Chinese Cabbage

CHEN Xiao-yan, YANG Xian, ZHANG Lu-lu

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

Abstract:The effects of six nitrogen(N) levels and inoculation with *Colletotrichum higginsianum* on plasmalemma permeability, polyphenoloxidase(PPO)activity, the content of ascorbic acid (AsA) and malonaldehyde(MDA)in Flowering Chinese Cabbage (*Brassica parachinensis*), and the relationship between membrane lipid peroxidation and incidence of anthracnose were studied. The results showed that anthracnose fungi could enhance the degradation of AsA, and the degradative effect of low N was more significant than that of high N. PPO activity of leaves was increased after inoculation with *C. higginsianum*. Compared with high, low N levels and non-fertilization, the suitable N level could significantly strengthen PPO activity. The integrity of cell membrane of leaves was gradually injured after infected with *C. higginsianum* in all N treatments, permeability of cell membrane augmented rapidly, but the cell membrane of the suitable N level was less injured than that of high N and non-fertilization treatments. With lastingness of the infection with *C. higginsianum*, MDA content in the leaves increased consistently, the results indicated that after the plant infected with *C. higginsianum*, membrane lipid peroxidation was strengthened and product of lipid peroxidation was increased. Low

收稿日期:2003-09-18

作者简介:陈晓燕(1975-),女,硕士研究生,现在珠海海关工作。通讯作者:杨 暹

(1964-),男,教授。

基金项目:“十五”国家重点攻关课题资助项目(2001BA508B21);“十五”广州市重点攻关项目(2002Z2-E0052)

and suitable N treatments would accelerate the level of lipid peroxidation in early stage after the plant infected with *C. higginsianum*, but inhibition effect in the later, while the effect of non-fertilization or high N level was contrary.

Key words: *Brassica parachinensis*; nitrogen nutrition; inoculation anthracnose; *Colletotrichum higginsianum*; membrane lipid peroxidation

前文已对氮营养与菜心炭疽病的发生及其与细胞保护酶活性的相互关系进行了研究^[1]. 本文进一步通过不同的氮营养水平处理, 探讨氮营养与菜心炭疽病及膜脂过氧化作用的关系, 为通过合理施用氮肥减少菜心炭疽病的发生提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与处理

试验材料、氮营养处理、炭疽病菌接种与前文^[1]一致.

1.2 测定方法

1.2.1 细胞膜透性的测定 参照柴丽娜等^[2]的方法. 将叶片擦净, 用 $d = 5 \text{ mm}$ 的打孔器打取 12 张叶片主脉一侧中部的小圆片, 放入 50 mL 的三角瓶中, 加入 12 mL 去离子水, 加塞, 静置 5 h 后, 用 DDS-11A 型电导仪测电导率, 沸水浴 10 min 后, 冰水冷却, 再测细胞膜全透电导率, 用前后电导率之比求出相对电导率, 即代表叶片细胞膜透性.

1.2.2 多酚氧化酶(PPO)活性的测定 参照李宁等^[3]的方法. 取 0.5 g 叶片加 5 mL 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠 pH 5.6 的缓冲液, 冰浴研磨, 4 °C 15 000 r/min 离心 15 min, 上清液用于酶活性测定. 4 mL 反应体系含有: 1 mL 酶液、3 mL PPO 反应混合液. 37 °C 水浴 10 min, 立即加 3 mL 6 mol/L 的尿素终止反应, 测定 $D_{460 \text{ nm}}$, 以每克鲜样每分钟 $D_{460 \text{ nm}}$ 变化 0.01 为 1 个酶活单位(U).

1.2.3 抗坏血酸(AsA)含量的测定 参照 Guri^[4]的方法. 叶片 AsA 用 $\varphi = 1\%$ HCl 提取, 用 2,6-二氯酚靛酚滴定至浅红色, 15 ~ 20 s 内不褪色, 以 $\varphi = 1\%$ HCl 作空白对照. 以每克鲜样所消耗的 2,6-二氯酚靛酚为 AsA 的含量(mg).

1.2.4 丙二醛(MDA)含量的测定 参照王爱国等^[5]的方法. 4 mL 反应体系含有: 1.5 mL 样品液、2.5 mL 0.2 mg/mL 三氯乙酸〔内含 0.005 mg/mL 硫代巴比妥酸〕. 100 °C 水浴 30 min, 迅速冰水冷却, 补充蒸发的水分, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液测定 MDA 的含量.

2 结果与分析

2.1 对叶片 AsA 含量的影响

由图 1 可知, 在未接种的植株叶片中, 不同的氮营养处理叶片的 AsA 含量变化不同, N_0 、 N_5 处理随着时间的推移, AsA 含量逐渐下降, 而 N_1 、 N_3 、 N_7 处理在生长过程中有升有降, N_9 处理呈先降低后上升的现象, 所有处理中, 以 N_3 处理的涨幅最大. 在接种的植株叶片中, 所有氮营养处理的 AsA 含量都是随着接种后时间的延长而不断下降, 而低氮营养处理的植株叶片 AsA 含量下降得快一些. 所有氮营养处理在接种后叶片 AsA 含量均低于各自的对照, 但各处理下降的幅度不同, 以 N_3 处理的下降幅度最大, 其次是 N_1 和不施肥处理, N_5 、 N_7 、 N_9 处理的下降幅度较小. 换言之, 低氮营养处理的植株叶片 AsA 含量下降的幅度较高氮营养处理的大. 可见, 炭疽病菌可促进叶片 AsA 的降解, 低氮与高氮相比, 其促进作用更明显.

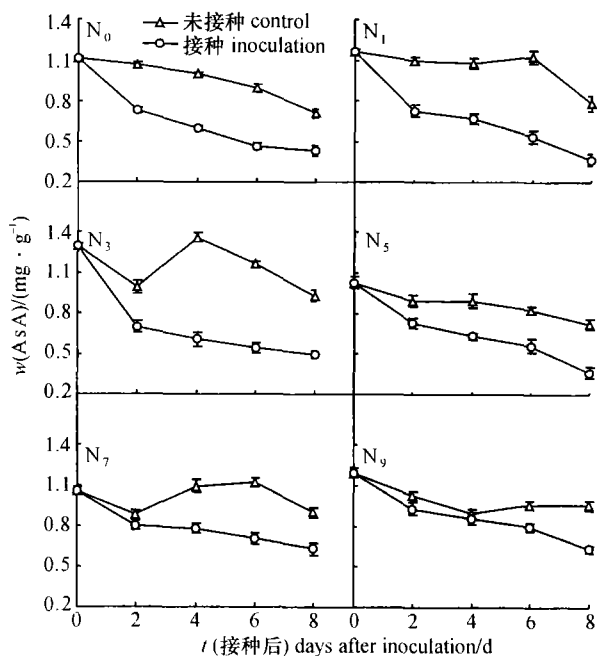


图 1 不同氮营养下炭疽病对菜心叶片 AsA 含量的影响
Fig. 1 The effect of anthracnose on AsA content of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese Cabbage

2.2 对叶片 PPO 活性的影响

PPO 是植物体内普遍存在的酚类氧化酶,在氧的作用下,将酚类物质进一步氧化成对病原菌毒性更强的醌类物质。

从图 2 可看到,在未接种的植株叶片中,所有氮营养处理 PPO 活性的变化平缓,没有明显的高峰值出现,各处理均随着时间的延长而缓慢上升,以 N₃、N₉ 处理的 PPO 活性较低,而 N₅、N₇、N₁、N₀ 处理较高。在接种的植株叶片中,各氮营养处理 PPO 活性变化规律不一致,除了 N₅、N₇ 处理在接种后 6~8 d,其 PPO 活性比未接种植株低以外,其他处理接种后的 PPO 活性均比未接种的对照植株高。在不同氮营养处理中,以 N₃ 处理接种后的 PPO 活性的增加幅度最大,其他处理的增幅较小。表明氮营养对 PPO 活性有明显的诱导作用,炭疽病菌感染后可促进叶片 PPO 活性的提高,适宜的氮营养(N₃ 处理)可加强炭疽病菌的诱导作用,而不施肥、低氮或过高氮营养的诱导作用较小。

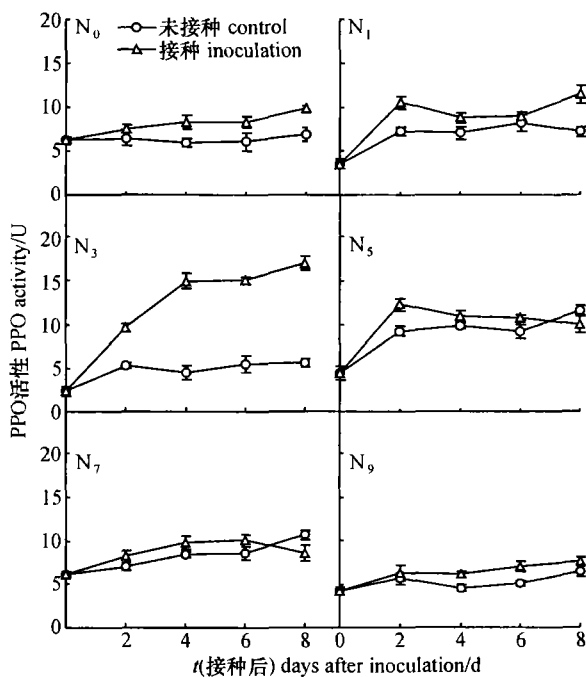


图 2 不同氮营养下炭疽病对菜心叶片 PPO 活性的影响
Fig. 2 The effect of anthracnose on PPO activity of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese Cabbage

2.3 对叶片细胞膜透性的影响

植物细胞膜系统是植物细胞和外界环境进行物质交换和信息交流的界面和屏障,膜系统的稳定性是细胞执行正常功能的基础。常用相对电导率来表示质膜透性差别。

由图 3 可见,在未接种的植株叶片中,除 N₉ 处理的膜透性呈“W”字形变化,其他氮营养处理的膜

透性变化都比较平缓,均表现为随着时间的延长而逐渐下降的趋势。所有氮营养处理的植株叶片的细胞膜完整性在受炭疽病菌侵染后,逐步遭到破坏,膜透性明显增加,但增加幅度大小有差异,其顺序为: N₇ > N₅ > N₉ > N₁ > N₀ > N₃。表明菜心叶片在受病原菌感染后,适宜氮营养(N₃ 处理)比不施肥和高氮营养处理能在一定程度上保持膜的稳定性,维持了细胞膜的完整性,从而延缓了病情的发展。

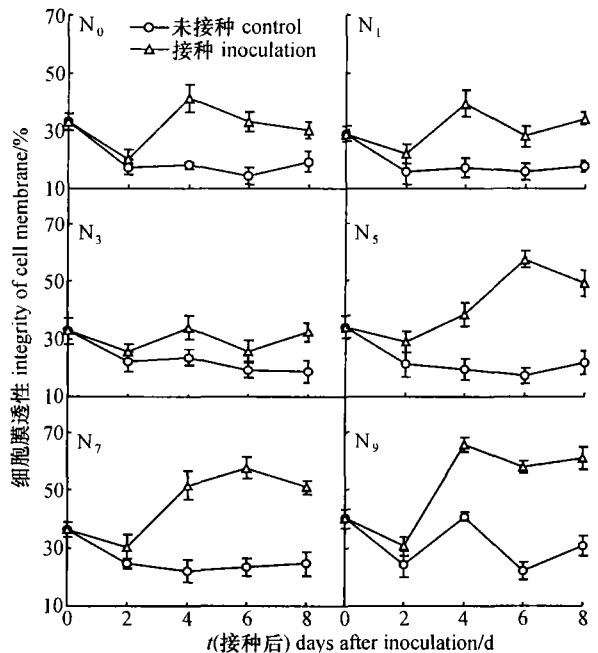


图 3 不同氮营养下炭疽病对菜心叶片细胞膜透性的影响
Fig. 3 The effect of anthracnose on cell membrane permeability of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese Cabbage

2.4 对叶片 MDA 含量的影响

植物器官衰老时,或在逆境条件下,往往发生膜脂过氧化作用,业已证明 MDA 是脂质过氧化的一种产物,可以表示细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱^[5]。

由图 4 可知,在未接种的植株叶片中,所有氮营养处理的叶片 MDA 含量变化都比较平缓,没有明显的高峰值出现。在接种的植株叶片中, N₀、N₅、N₉ 处理的叶片 MDA 含量变化规律相同,即随着接种后时间的推移,MDA 含量持续上升,于接种后第 8 d 达到最高值; N₁、N₃、N₇ 处理的叶片 MDA 含量先增加后下降,其中 N₁、N₃ 处理于接种后第 4 d 达到最高值,而 N₇ 处理在接种后第 6 d 达到最高值。表明,脂质过氧化作用以 N₁、N₃ 处理最早, N₇ 处理较早, N₀、N₅、N₉ 处理最迟。所有处理接种叶片的 MDA 含量均高于各自对照,表明植株受到炭疽病菌侵染后,脂质过氧化作

用加强,脂质过氧化产物增加.同时还可以看出,经炭疽病菌侵染后,低氮和适宜氮营养(N_3 处理)早期会加速膜脂过氧化水平,但后期对脂质过氧化作用有所抑制,而不施肥或高氮水平下的作用效应正好相反.

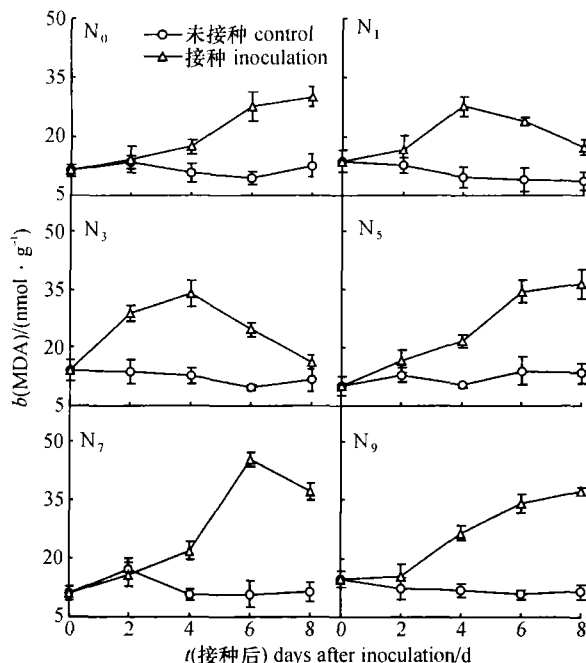


图4 不同氮营养下炭疽病对菜心叶MDA含量的影响

Fig. 4 The effect of anthracnose on MDA content of leaves under different N nutrition in Flowering Chinese Cabbage

3 讨论

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).活性氧对作物也会造成一定的伤害:(1)启动膜脂过氧化作用,引起膜变相,破坏膜结构,增大细胞膜透性,MDA等膜脂过氧化产物增加,造成对细胞的伤害.(2)损伤生物大分子,氧化蛋白质中的氨基酸,使蛋白质合成受阻,原有蛋白质受破坏,攻击巯基,使分子发生交联聚合反应使酶失活,对DNA造成损伤^[6].植物体内的活性氧清除系统由保护酶系和抗氧化性物质两部分组成.保护酶类主要由SOD、POD、CAT、PPO等组成,抗氧化性物质主要有AsA、维生素E等.这两类活性氧清除系统的活性或含量在受到病原物侵染或诱发物处理时发生变化,并与活性氧的积累有关.

AsA是生物体内重要的物质之一,动物或人体若缺乏AsA可诱导多种疾病.关于AsA与植物抗/感病性关系的研究较少.目前存在着3种不同的意见^[7]:(1)认为AsA有利于抗病,且发现抗病品种的

组织中有AsA积累,感染后高感品种所含的AsA较少;(2)认为AsA可抑制植物抗病性的表达,感病品种体内积累较高量的AsA;(3)认为AsA与植物抗/感病性无关.本试验的研究结果表明,在接种的植株叶片中,所有氮营养处理的AsA含量随接种后时间的延长而不断下降,这与水稻幼苗叶片在接种白叶枯病原菌的AsA含量的结果相一致^[8].另外,从整体上看,低水平氮营养处理的植株叶片AsA含量在受炭疽病菌侵染后下降的幅度和速率比高水平氮营养处理的大,说明AsA含量的变化与菜心炭疽病的发生之间存在着一定的关系.

AsA能够直接清除单线态氧和超氧阴离子,也能通过维生素E终止自由基链式反应.AsA还能直接清除 H_2O_2 ,也可以通过保持某些酶的辅金属离子处于还原状态而抵抗自由基^[9].AsA是许多POD的天然底物,而POD与植物抗病有关.因此推测AsA在抗病中的作用可能是维持细胞正常的氧化-还原状态.从本试验结果来看,在 N_3 、 N_1 、 N_0 处理中,AsA含量的迅速下降可能是由于清除体内活性氧尤其是 H_2O_2 而降解的结果.至于这种结果对植株抗病的积极作用目前还没有更多的证据.或许可以从抗氰呼吸(cyanide-resistance respiration)作用中的重要酶之一——AsA氧化酶活性变化的研究中得到进一步的答案.另外,也有研究表明,适当浓度的AsA对病菌孢子的萌发和芽管的伸长有一定的刺激作用^[7].

病原菌侵染可引起植物体内PPO活性的升高^[10,11].PPO把酚类物质氧化成对病原菌毒性更强的醌或其衍生物,因而与植物的抗病性呈正相关^[10,12].在本试验中,PPO活性的增量虽没有POD那么显著,但其增量与病情指数之间也呈负相关($r = -0.8025$),这与前人的研究结果一致^[13].这是由于在氮营养处于较低或适当的水平下,植株感染炭疽病菌后,细胞受到的破坏较轻,细胞结构部分解体,PPO与底物接触,将酚氧化成棕褐色的醌,醌对病原菌有毒杀作用,减轻了对植株的危害,发病较轻,病情指数小.而氮营养水平较高时,植株在感染炭疽病菌后,虽然位于叶绿体内的PPO得以释放,但由于细胞受到的破坏程度严重,可能使底物酚流出了胞外,未能尽早多地与PPO结合,因而对病原菌的毒害作用减弱,发病严重,病情指数高.

MDA是细胞质膜受自由基活性氧攻击的最终氧化产物,它们都可以反映出作物体内自由基等活性氧的水平,间接地反应植物体内的活性氧代谢的变

化,是膜脂氧化的指标之一.菜心植株感染炭疽病菌后,叶片细胞膜透性明显增加,膜脂过氧化产物MDA含量迅速增加,脂质过氧化作用加强,但适宜N营养比不施肥和高N营养处理能在一定程度上保持细胞膜的稳定性,维持了细胞膜的完整性,改善生理机能,逐步减轻膜脂过氧化水平.可见,在植株感染炭疽病菌后,适宜氮营养(N₃处理)可有效地调控活性氧代谢平衡体系,降低脂质过氧化作用,维持细胞膜的完整性,提高了植株内部的抗病性能,减轻或延缓了病情的发展.

参考文献:

- [1] 杨暹,陈晓燕,冯红贤.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[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2004, 25(2): 26-30.
- [2] 柴丽娜,齐小明.冬小麦幼苗细胞膜透性的变化与品种抗旱性的关系及测定[J]. 北京农学院学报, 1999, 14(3):60-63.
- [3] 李宁,郁志芳,赵友兴,等.莲藕多酚氧化酶的酶学特性[J]. 江苏农业学报, 2002, 18(1):63-64.
- [4] GURI A. Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone[J]. Can J Plant Sci, 1983, 63:733-737.
- [5] 王爱国,邵从本,罗广华.丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1996, (2):55-57.
- [6] 王爱国. 植物生理与分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 1998:366-389.
- [7] 陈利锋,叶茂炳,陈永幸,等.抗坏血酸与小麦抗赤霉病性的关系[J]. 植物病理学报, 1997, 27(2):113-118.
- [8] 肖用森,王正直,郭绍川.白叶枯病菌对杂交稻幼苗叶片中活性氧清除剂的影响[J]. 作物学报, 1998, 24(1): 118-122.
- [9] LARSON R A. The antioxidants of higher plant[J]. Phytochemistry, 1988, 27:969-978.
- [10] 袁章虎,曲健木.低酚棉抗枯萎病生化机制初探[J]. 棉花学报, 1995, 7(2):100-104.
- [11] GENTILE I A, FERRARIS L, MATTA A. Variation of phenoloxidase activities as a consequence of stress that induce resistance to *Fusarium wilt* of tomato[J]. J Phytopathol, 1988, 122:45.
- [12] SCHNEIDER S, ULLRICH W R. Different induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1994, 45:291.
- [13] 吴丁,芦翠乔.植物生理学与跨世纪农业研究[M]. 北京:科学出版社, 1999:358-361.

【责任编辑 柴焯】

公 告

本刊已与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社合作,编辑出版本刊从创刊以来的科技期刊精品库,作者如不同意的,请从速函告,以便删除.此告!

华南农业大学学报编辑部

2004-06-09