

甘薯长喙壳菌株与芋头互作中抗氧化酶活性的变化

余磊^{1,2} 高玲玲² 郭建伟² 陈小龙² 黄琼² 陈海如²

1. 昆明学院农学院, 昆明 650214;

2. 云南农业大学植物病理重点实验室/教育部农业生物多样性与病害控制重点实验室, 昆明 650201

摘要 以芋头块茎组织为供试材料, 用来自石榴、甘薯和芋头的甘薯长喙壳 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted) 菌株分别接种芋头块茎, 同期观察 3 种不同致病性的菌株在互作中芋头过氧化物酶(POD)、超氧歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量的变化。结果表明: 接种 3 个菌株 5 h 后, 芋头块茎组织开始呈微红色, 对照块茎组织无颜色变化; 芋头菌株和石榴菌株均可在芋头块茎组织表面生长, 并最终致其腐烂, 表现出亲和反应; 接种甘薯菌株后芋头块茎组织表面无菌丝生长, 表现出非亲和反应。同期酶活性及膜脂过氧化结果显示: 在接种 25~30 h 后, 芋头块茎组织中 POD、SOD 和 CAT 活性达到高峰, 且非亲和接种(甘薯菌株)块茎组织高于亲和接种(芋头菌株、石榴菌株)块茎组织; 在接种 10 h 后, 芋头块茎组织中 MDA 含量明显升高, 其表面的颜色呈浅褐红色, 在接种 20 h 后含量达到最高值, 随后始终维持较高水平, 且非亲和接种块茎组织高于亲和接种块茎组织。

关键词 甘薯长喙壳; 芋头; 抗氧化酶

中图分类号 S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0061-05

石榴枯萎病 (pomegranate wilt) 是我国近几年新发生的一种果树毁灭性病害, 其病原菌为甘薯长喙壳 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted, 简称 Cf) [1]。甘薯长喙壳病菌广泛分布于世界各地, 能危害多种木本和草本植物[2-3]。甘薯长喙壳病菌多数具有明显的寄主专化性, 并且各种寄主专化性的株系呈现出不同的地理分布[4-6]。

研究表明: 分离自石榴和芋头上的甘薯长喙壳病菌能够交叉侵染, 并没有显示出寄主专化性; 而分离自寄主甘薯的甘薯长喙壳病菌既不能侵染石榴也不能侵染芋头, 表现出显著的寄主专化性[7]。虽然研究结果证明很多菌株具有寄主专化性, 但寄主专化性株系的数量, 以及这些株系间的界限还不完全清楚, 相关报道较少。笔者采用来自芋头、石榴和甘薯的甘薯长喙壳病菌分别接种芋头块茎组织, 同期测定芋头中抗性相关物质及酶活性的变化, 旨在揭示具有不同寄主专化性的甘薯长喙壳病菌与同种植物组织互作时的生化机制, 为进一步研究不同寄主专化性的同种真菌之间的致病性差异提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

石榴 (*Punica granatum*) 枯萎病菌株 (CQS2)、芋头 (*Colocasia esculenta*) 黑腐病菌株 (YP1) 和甘薯 (*Ipomoea batatas*) 黑斑病菌株 (SP1) 均由云南农业大学植物病理重点实验室提供。

孢子悬浮液的制备: 经单孢分离的病原菌各菌株活化后, 在 PDA 培养基上 26 °C 富集培养 7 d。然后将纯培养的病原菌孢子用灭菌去离子水洗脱并进行梯度稀释, 使孢子浓度为 1.0×10^6 个/mL。

1.2 供试植物

选取大小均匀、表面光洁无病斑的芋头块茎, 先用清水洗净, 再放入 0.2% 的次氯酸溶液中表面消毒 10 min, 然后用灭菌蒸馏水洗 3 次。将芋头块茎切成 2~3 cm 厚的圆片, 将调整至相同浓度的 3 株病原菌分生孢子悬液均匀涂于块茎圆片的两侧, 置于 28 °C 培养箱中培养 (湿度为 60%~70%), 以灭菌蒸馏水接种的切伤块茎圆片作为伤害组织对照。

芋头块茎圆片接种后, 分别取培养 0、10、20、

收稿日期: 2010-03-25; 修回日期: 2010-08-27

基金项目: 云南省科技攻关计划 (2003NG08) 和教育部博士点基金项目 (20095302110003)

余磊, 云南农业大学植物保护学院博士研究生。研究方向: 植物病理学。E-mail: yulei0425@163.com

通讯作者: 黄琼, 博士, 教授。研究方向: 植物病理学。E-mail: huangqiong88hs@yahoo.com.cn

25、30、40、50 h 后的接种组织进行酶活性测定,并同时取灭菌蒸馏水接种的组织作为对照。每处理重复 3 次。

1.3 抗氧化酶活性的测定

1) 过氧化物酶(POD)。参照 Kochba 等^[8]的方法测定。以 1 min 内 470 nm 处吸光值变化 0.001 为 1 个酶活性单位(U_1)。

2) 超氧歧化酶(SOD)。参照 Giannopolitis 等^[9]和林植芳等^[10]的方法测定。测定 560 nm 处吸光度,并以抑制 NBT 光化还原反应 50% 为 1 个酶活性单位(U_2)。

3) 过氧化氢酶(CAT)。参照潘汝谦等^[11]的方法测定。以 1 min 内 240 nm 处吸光值变化 0.1 为 1 个酶活性单位(U_3)。

1.4 丙二醛(MDA)含量的测定

参照 Dhindsa 等^[12]的方法进行。

1.5 数据处理

利用 SPSS 数据处理系统,分别对供试菌株与芋头块茎组织 7 个时期各生理指标变化值进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 甘薯长喙壳菌株致病性的分化

试验结果表明:分离自 3 种不同寄主的甘薯长喙壳菌株接种芋头组织,5 h 后芋头块茎表面均开始呈微红色,对照处理芋头块茎无颜色变化。芋头菌株和石榴菌株均可在芋头块茎组织上快速生长,产生大量菌丝体及子囊壳,最终引起组织变黑且腐烂(120 h),并能在病害组织分离到相应的病原菌菌株,说明芋头菌株和石榴菌株对芋头块茎组织均具有强烈的致病性(亲和反应)。甘薯菌株在接种到芋头组织后,虽然后期组织表面也呈微红色至褐红色(10~50 h),但观察不到菌丝生长或子囊壳产生,并难以在接种组织附近分离到甘薯长喙壳菌株,表现出非亲和反应。

2.2 过氧化物酶(POD)活性的变化

试验结果表明:接种 10 h 后芋头块茎组织中 POD 活性明显升高,总体趋势均高于同期对照处理(图 1)。接种甘薯菌株(SP1)后,块茎组织产生的 POD 活性峰值及持续时间均高于石榴菌株(CQS2)和芋头菌株(YP1),且 POD 活性上升快,净增加值也大。接种甘薯菌株 30 h 后,芋头块茎组织中 POD 活性达到最大值,高于接种亲和性菌株 YP1

和 CQS2,且在 2 个亲和性菌株之间其酶活性上升幅度无明显差异。之后,接种亲和性菌株的芋头块茎组织中 POD 活性急剧下降,接种甘薯菌株的 POD 活性下降值较小,并维持一定水平。

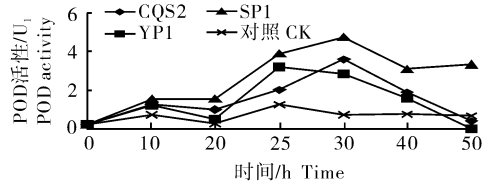


图 1 接种菌株后芋头块茎 POD 活性的变化
Fig. 1 Changes of POD activities in taro tubers after inoculation with strains

2.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

试验结果表明:接种甘薯菌株(SP1)10 h 后芋头块茎组织中 SOD 活性明显升高,以后一直维持较高酶活水平,且明显高于对照处理(图 2)。接种芋头菌株(YP1)和石榴菌株(CQS2)后芋头块茎组织中 SOD 活性平稳上升,并在 30 h 时均达到最大值,随后快速下降,其中接种芋头菌株的 SOD 活性下降最快,在 50 h 时 POD 活性已经低于对照接种正常水平。

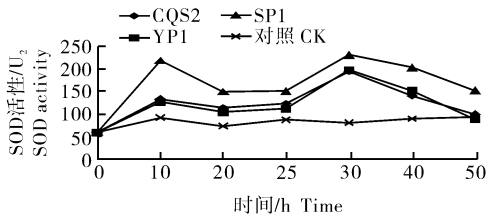


图 2 接种菌株后芋头块茎 SOD 活性的变化
Fig. 2 Changes of SOD activities in taro tubers after inoculated with strains

2.4 过氧化氢酶(CAT)活性的变化

试验结果表明:接种后芋头块茎组织中 CAT 活性呈先升后降又下降的趋势(图 3)。接种非亲和性菌株(SP1)20 h 后,芋头块茎组织中 CAT 活性高于接种亲和性菌株(YP1 和 CQS2),并都在 25 h 时达到最大值。接种亲和性菌株(YP1 和 CQS2)30 h 后,芋头块茎组织中 CAT 活性下降到对照处理水平以下,而接种非亲和性菌株后的 CAT 活性仍维持较高水平,且高于对照处理。这说明在亲和性菌株与芋头块茎组织的整个互作过程中,致病菌株芋头菌株(YP1)、石榴菌株(CQS2)在接种 30 h 后,由于病斑的扩展,组织细胞的死亡,染病组织中活性氧积累 $O_2^{\cdot-}$ 和膜脂过氧化加强,从而导致了 CAT 活性的下降。

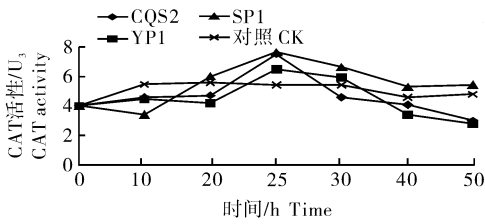


图 3 接种菌株后芋头块茎 CAT 活性的变化
Fig. 3 Changes of CAT activities in taro tubers after inoculation with strains

2.5 丙二醛 (MDA)含量的变化

试验结果表明:接种 10 h 后,芋头块茎组织中膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)的含量明显升高,3 种寄主菌株接种后芋头块茎表面的颜色均变成微红(图 4)。接种非亲和性菌株后,芋头块茎组织中 MDA 含量高于接种亲和性菌株。非亲和性互作中 MDA 含量在 20 h 时达到最大值,之后始终维持在较高水平。说明在整个接种期间非亲和性互作比亲和性互作产生的过氧化反应高,伤口对照组织在整个接种期间没有颜色变化,仅被观察到在接种早期(10 h)时过氧化水平有短暂升高,并且维持较低的稳定水平。

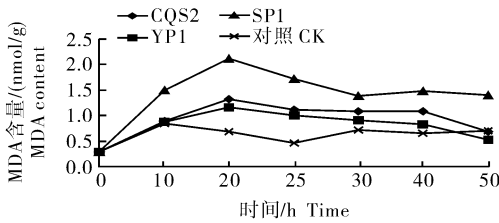


图 4 接种菌株后芋头块茎 MDA 含量的变化
Fig. 4 Changes of MDA content in taro tubers after inoculation with strains

3 讨 论

在病原菌侵染寄主植物的互作中,一个显著而普遍的病理现象是植物呼吸速率的升高。植物的抗病机制也是多种多样的,在病原物与寄主植物之间存在的基因对基因关系中,病原物无毒基因产物与寄主中相应抗病基因产物互作从而导致不亲和反应,使病原物在植物中的定殖和扩展受到抑制,甚至在侵染初期就破坏了亲和关系。其防卫反应的作用和表现特点因寄主-病原物的组合不同而有所差异,它对病原物侵入的生化反应是以酶的催化活动来实现的,而且它的抗病防卫反应(抵御病原菌)的有效性取决于这些反应相关的抗病基因是否在特定

的寄主部位以较早的时间达到较高的表达水平^[13]。

Kojima 等^[14]和 Uritani 等^[15]研究了甘薯黑斑病病原菌(非亲和)在接种芋头块茎组织表面后的反应,证实甘薯菌株的分生孢子可以在组织表面萌发,但其后期生长受到抑制。Masui 等^[16]证明分离自甘薯的菌株接种芋头块茎后使接种体产生过氧化反应,并生成抗真菌物质 9,12,13-trihydroxy-(E)-10-octadecenoic acid。本研究的结果也表明:3 种寄主的甘薯长喙壳病菌在接种 5 h 后,芋头块茎组织表面开始呈微红色(对照无变色)。来自甘薯的 Cf 在接种到芋头组织后没有被观察到菌丝生长或子囊壳的产生,后期组织表面颜色仅呈微红色至浅褐红色,表现出非亲和反应。芋头和石榴菌株均可在芋头块茎组织上快速生长,且均在块茎组织表面产生大量菌丝体及子囊壳,并最终引起组织变黑且腐烂(120 h 时),说明芋头和石榴菌株对芋头组织均具有强烈的致病性(亲和)。

POD、SOD 和 CAT 分别是植物体内担负清除 O₂^{·-} 和 H₂O₂ 的重要防御酶系统,参与了植物抗病次生物质,如木质素、酚类化合物、植保素和活性氧的代谢,在植物抗病防卫反应中起着重要作用。Meagher 等^[17]采用对甘薯具有不同亲和性的甘薯长喙壳菌分别接种甘薯块根组织,测定了 POD、CAT 及相关酶活性,结果表明,接种不致病的甘薯长喙壳病菌(非亲和)后,甘薯组织的 POD 和 CAT 活性比接种致病的甘薯长喙壳病菌(亲和)高。本试验结果也表明,在非亲和性菌株(甘薯)和亲和性菌株(芋头和石榴)接种后 10 h,芋头块茎组织中 POD 活性均明显升高(均高于对照),非亲和性菌株接种互作中产生的 POD 活性峰值及持续时间均高于亲和性互作,且在亲和性菌株之间其酶活性上升幅度无明显差异。

CAT 和 SOD 的活性变化具有明显的阶段性:在侵染初期,SOD 和 CAT 的活性一般呈上升趋势,且明显高于同期对照处理。由于 SOD 和 CAT 的主要生理功能是清除生物体内的活性氧 O₂^{·-} 和 H₂O₂,说明亲和性甘薯长喙壳病菌入侵芋头块茎后,随着病原菌的扩展,侵入芋头体内的病原菌不断地破坏植物体内的保护酶系统,进而表现为 SOD 和 CAT 活性在早期病原菌侵染升高,在后期迅速下降。非亲和的甘薯菌株可诱导芋头组织产生较高的 SOD 和 CAT 活性,并在一定时间内维持较高水平。因此,在甘薯长喙壳菌侵染的早期,芋头块茎组织中

相关酶活性大幅度上升,这与寄主在病程中早期限制病斑扩展的能力有关。说明生物体在受到寄主病原菌和非寄主病原菌侵染时,生物体本身具有一定的适应和抵御能力,但这种能力是有限度的,超过一定限度时细胞保护酶系统的平衡就会遭到破坏,进而形成病斑或其他类似的病症表现,为病原菌的进一步入侵提供条件。

近年来发现 H_2O_2 、水杨酸等在植物抗病反应中可能作为信号分子,参与抗病反应信息传递,进而激发植物细胞内的各种防卫反应和系统获得性^[18-19]。水稻与稻瘟病菌、马铃薯与晚疫病菌等病害互作中的活性氧及其代谢酶的产生和含量变化的研究表明, H_2O_2 在植物抗病反应中起着重要作用。病菌侵染后植物体内活性氧的产生与积累是启动膜脂过氧化的主要原因之一^[20],而丙二醛(MDA)含量的变化是衡量膜脂过氧化程度的一个重要指标。Masui 等利用芋头菌株(亲和)和甘薯菌株(不亲和)分别接种芋头组织,比较了芋头块茎在接种两种病原菌后的 MDA 含量(膜脂过氧化物)及相关酶活性变化,认为这些抗性酶物质的产生是在寄主植物系统内寄主与病原菌互作早期的结果(反应)^[21]。本研究结果也表明,在甘薯长喙壳病菌侵染初期,芋头块茎中膜脂过氧化产物——丙二醛(MDA)在接种 10 h 时明显升高(高于对照),芋头块茎表面的颜色呈微红。MDA 含量总体表现为非亲和菌株接种组织大于亲和性接种组织。非亲和菌株接种组织在 20 h 时达到最大值后始终维持在较高的含量水平,说明在整个接种期间非亲和菌株接种组织比亲和菌株组织中产生了相对较高的膜脂过氧化反应,伤口对照组织在整个接种期间没有变色,仅被观察到在接种早期(10 h)时过氧化水平有个短暂的升高,并且维持在一个较低的相对稳定的水平。

参 考 文 献

- [1] HUANG Q, ZHU Y Y, CHEN H R, et al. First report of pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Yunnan (China)[J]. Plant Disease, 2003, 87: 1150.
- [2] ENGELBRECHT C J B, HARRINGTON T C. Intersterility, morphology, and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* from sweet potato, cacao, and sycamore[J]. Mycologia, 2005, 97(1): 57-69.
- [3] JOHNSON J A, ENGELBRECHT C J B, HARRINGTON T C. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex[J]. Mycologia, 2005, 97(5): 1067-1092.
- [4] MIZUKAMI T. Comparison of the pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata* and *Endoconidiophora* sp. causal fungus of taro black-rot, on sweet potatoes and taroes[J]. Sci Bull Fac Agric Kyushu Univ, 1950(12): 5-9.
- [5] MINEO KOJIMA, IKUZO URITANI. Isolation and characterization of factors in sweet potato root which agglutinate germinated spores of *Ceratocystis fimbriata*, black rot fungus[J]. Plant Physiol, 1978, 62: 751-753.
- [6] GREMMEN M. *Ceratocystis fimbriata*, a fungus associated with poplar canker in Poland[J]. European Journal of Forest Pathology, 1976, 7(1): 44-47.
- [7] 黄琼. 甘薯长喙壳病菌鉴定、致病性与系统发育研究[D]. 昆明: 云南农业大学植物保护学院, 2009.
- [8] KOCHBA J, LAVEE S, SPIEGE R P. Difference in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and nonembryogenic 'Shamoufi' orange ovular callus lines[J]. Plant Cell Physiol, 1977, 18: 463-467.
- [9] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiol, 1977, 59: 309-314.
- [10] 林植芳, 李双顺, 林桂株, 等. 水稻组织的衰老与超氧化物歧化酶及膜脂过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 605-615.
- [11] 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.
- [12] DHINDSA R S, DHINDSA P P, THORPE T A. Leaf senescence correlated with increase levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase[J]. J Exp Bot, 1981, 32: 93-101.
- [13] 杨民和, 郑重. 水稻受稻瘟病菌侵染后过氧化物酶定位的超微观察[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(1): 57-62.
- [14] KOJIMA M, URITANI I. The possible involvement of a spore agglutinating factor(s) in various plants in establishing host specificity by various strains of black rot fungus, *Ceratocystis fimbriata*[J]. Plant and Cell Physiology, 1974, 15(4): 733-737.
- [15] KOJIMA M, URITANI I. Possible involvement of furanoterpenoid phytoalexins in establishing host-parasite specificity between sweet potato and various strains of *Ceratocystis fimbriata*[J]. Physiol Plant Pathol, 1976, 8: 97-111.
- [16] MAASUI H, KONDO T, KIJIMA M. An antifungal compound, 9, 12, 13-trihydroxy-(E)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata*[J]. Phytochemistry, 1989, 28(10): 2613-2615.
- [17] MEAGHER R B, DEVAY J E, KOSUGE T. Oxidative enzymes of *Ceratocystis fimbriata* Isolates differing in host specificity[J]. Physiologia Plantarum, 1967, 20: 726-732.
- [18] 张智慧, 聂燕芳, 何磊, 等. 外源水杨酸诱导水稻相关防御酶活性及内源水杨酸含量的变化[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 541-545.
- [19] 张衍荣, 王小菁, 张晓云, 等. 水杨酸对豇豆枯萎病的抑制作用

[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(6): 610-613.

[21] MASUI H, KOJIMA M. Lipid peroxidation and its role in taro tubers infected by *Ceratocystis fimbriata* [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54: 1689-1695.

[20] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物病原物互作中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 377-385.

Oxidative enzymes changes in the interactions between *Ceratocystis fimbriata* isolates and taro

YU Lei^{1,2} GAO Ling-ling² GUO Jian-wei² CHEN Xiao-long²
HUANG Qiong² CHEN Hai-ru²

1. College of Agronomy, Kunming University, Kunming 650214, China;

2. The Ministry of Education Key Laboratory for Agriculture Biodiversity and Plant Disease Management/Key Laboratory of Plant Pathology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract A taro strain (compatible or pathogenic), a pomegranate (*Punica granatum*) strain (compatible or pathogenic) and a sweet potato strain (incompatible or non-pathogenic) of *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted, were inoculated into taro (*Colocasia esculenta* Schott) tubers. Subsequently, the changes of the activities of peroxidase (POD), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in inoculated taro disks were observed. The results showed that the surfaces of the taro tuber inoculated by all the strains turned reddish under the same conditions after 10 h of inoculation. The taro strain and the pomegranate strain were pathogenic to and compatible with taro, while the sweet potato strain was non-pathogenic to and incompatible with taro. POD, SOD, CAT increased to a higher level in incompatible (sweet potato) strain than those in compatible (pomegranate and taro) strains after 25-30 h inoculation with those pathogens respectively. The surfaces of the taro tuber inoculated by all the strains turned mahogany after 10 h inoculation, whose MDA increased up to a peak at 20 h.

Key words *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted; taro; antioxidant enzyme

(责任编辑:陈红叶)