

## 不同油菜品种对菌核病抗病性差异的生理生化分析

高宁馨, 母玉翠, 蒋冰心, 李毛毛, 高智谋\*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

**摘要:** 为了探讨不同油菜品种对菌核病的抗病机制, 以 2 个抗病品种中油 821、德油 5 号和 2 个感病品种皖油 14、杂优 1 号为材料, 采用草酸浸叶以及不同致病力的核盘菌菌株 NG4、WW2 接种不同抗性的油菜品种后, 对其叶片中丙二醛 (MDA)、脯氨酸 (Pro)、可溶性糖、可溶性蛋白含量的变化规律进行分析。结果表明, 未接种时 4 个油菜品种 MDA 含量差异很小, 接种发病后抗、感材料 MDA 含量均增加, 但感病材料 MDA 含量明显高于抗病材料, 且上升的幅度大。未接种时抗病材料 Pro 的含量高于感病材料, 接种发病后 Pro 含量都上升, 但抗病品种明显高于感病品种。可溶性糖含量都是先升高后降低, 感病品种上升幅度显著高于抗病品种。接种后, 抗性品种接种后 24 h 可溶性蛋白的含量达到最低值, 48 h 达最大值, 后下降但高于对照。感病品种的含量 24 h 达到最大值, 后降低。

**关键词:** 油菜菌核病菌; 品种; 抗病性; 草酸; 丙二醛; 脯氨酸; 可溶性糖; 可溶性蛋白

中图分类号: S435.654

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0672-05

### Physiological and biochemical analyses of resistance of different rape varieties to *Sclerotinia sclerotiorum*

GAO Ning-xin, MU Yu-cui, JIANG Bing-xin, LI Mao-mao, GAO Zhi-mou

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** In order to explore the resistance mechanism of different rapeseed varieties to *Sclerotinia sclerotiorum*, we chose two resistant varieties (Zhongyou 821, Deyou 5) and two susceptible varieties (Wanyou 14, Zayou 1) as experimental materials for analyzing the content changes of malondialdehyde (MDA), proline (Pro), soluble sugar and soluble protein (SP) after inoculation with different virulence of *S. sclerotiorum* isolates NG4, WW2 and oxalic acid treatment. The results showed that the content of MDA in the resistant and susceptible materials had no significant difference. After infection, all increased and MDA in susceptible varieties grew more significantly than that of resistant varieties. Contents of Pro in the resistant varieties were higher than that in the susceptible varieties when non-vaccinated. After inoculation, all increased and resistant varieties grew more significantly than that of susceptible varieties. The content of soluble sugar was first increased and then decreased, and susceptible varieties grew more significantly than that of resistant varieties. The content of SP in resistant varieties reached a minimum value 24 hours after inoculation, reached the maximum 48 hours after inoculation, and then decreased but was still higher than that in the control. The content of SP in susceptible varieties reached a maximum value 24 hours after inoculation, and then decreased.

**Key words:** *Sclerotinia sclerotiorum*; varieties; resistance; oxalic acid; malondialdehyde; proline; soluble sugar; soluble protein

油菜菌核病是我国油菜上的主要病害之一, 严重制约油菜生产。目前, 对于该病的防治主要采取以农业防治为基础辅以药剂防治的综合防治措施,

而在农业防治中选育选用抗 (耐) 病品种是最经济有效的措施<sup>[1-2]</sup>。已有研究报道, 核盘菌在侵染过程中分泌的草酸毒素是致病因子之一<sup>[3-5]</sup>; 植物受病原

收稿日期: 2012-06-04

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201103016) 和安徽省现代产业 (油菜) 体系专项经费资助。

作者简介: 高宁馨, 女, 硕士研究生。

\* 通讯作者: 高智谋, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: gaozhimou@126.com

物侵染后, 体内的丙二醛 (MDA)、脯氨酸 (Pro)、可溶性糖和可溶性蛋白 (SP) 含量发生变化与品种抗病性之间具有一定的相关性<sup>[6-9]</sup>。这些相关性对于研究抗病性机制和抗病育种具有重要意义。目前, 关于油菜品种对菌核病抗病性的生理生化机制研究已有一些报道, 但大多侧重于油菜植株内各种防御酶活性与抗病性的相关性研究, 对植株体内非酶类物质与抗病性的关系研究较少。本研究选用油菜抗病品种和感病品种为实验材料, 采用草酸与核盘菌分别处理离体的油菜苗期叶片的方法测定其丙二醛 (MDA)、脯氨酸 (Pro)、可溶性糖及可溶性蛋白 (SP) 含量动态变化, 揭示并探讨这些生理生化物质与油菜抗病机制及菌核病致病机理的关系, 为油菜菌核病的综合治理和油菜抗病品种培育及利用提供必要的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

油菜品种: 中油 821, 德油 5 号, 较抗菌核病; 皖油 14 号, 杂优 1 号, 较感菌核病; 均为甘蓝型油菜品种, 由合肥丰乐种业公司提供。

供试菌株: NG4 和 WW2 分别来自安徽省宁国市和无为县油菜菌核病组织或菌核, 采用组织分离法<sup>[10]</sup>分离、纯化, 经鉴定为核盘菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 菌株。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 供试菌株的准备 将供试菌株经活化后接种

在 PDA 培养基上, 置 25℃ 黑暗培养 4 d 后, 用灭菌打孔器 (直径 0.5 cm) 沿菌落边缘打取菌碟备用。

**1.2.2 不同油菜品种抗性鉴定** 采用离体叶片接种法<sup>[11]</sup>。在油菜 7、8 叶期间, 选取同一叶位大小相近的叶片, 用清水洗净、晾干。取菌碟接种于叶片主叶脉两侧, 菌丝体面紧贴在叶面正面, 叶柄末端用浸湿的滤纸保湿放入平皿中, 置于 25℃、RH 为 90% 的智能人工培养箱中。接种后 50 h 观察并记录病斑直径, 重复 3 次。

**1.2.3 生理生化指标的测定** 选生长健壮的各供试品种油菜苗, 第 1 组接种参照抗性鉴定方法, 于叶片中部接种菌碟; 第 2 组为草酸浸叶, 将叶片基部浸入 5 mmol·L<sup>-1</sup> 草酸溶液中; 第 3 组为清水对照, 将叶片浸入清水; 重复 3 次。

于接种当天及接种后连续 4 d 对处理的叶片进行生理生化指标测定。参照孙群<sup>[12]</sup>、郝再彬<sup>[13]</sup>、郝建军<sup>[14]</sup>的方法, 分别测定处理叶片的丙二醛、可溶性蛋白、可溶性糖、游离脯氨酸含量, 设 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试油菜品种对菌核病的抗病性测定

测定结果(表 1 和 图 1)表明, 接种后感病品种皖油 14 和杂优 1 号所形成的病斑直径极显著大于抗菌核病品种中油 821 和德油 5 号, 进一步验证了供试的 4 个油菜品种对油菜菌核病的抗病性, 同时证明本研究所采用的供试品种及接种方法是合适的。

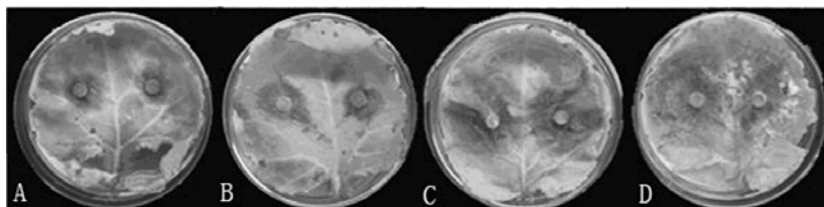
表 1 不同油菜品种接种油菜菌核病菌不同菌株后所形成的病斑直径

Table 1 The lesion diameters of different rape varieties inoculated with different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*

油菜品种 Cultivars of rape	平均病斑直径/cm Average diameters of disease lesions	
	接种菌株 NG4 Inoculating with isolate NG4	接种菌株 WW2 Inoculating with isolate WW2
中油 821 Zhongyou 821	2.32 <sup>Aa</sup>	0.90 <sup>Aa</sup>
德油 5 号 Deyou 5	2.65 <sup>Aa</sup>	1.09 <sup>Aa</sup>
皖油 14 Wanyou 14	4.98 <sup>Bb</sup>	2.02 <sup>Bb</sup>
杂优 1 号 Zayou 1	5.05 <sup>Bb</sup>	2.25 <sup>Bb</sup>

注: 表中数据后具有相同小写字母的相互间无显著差异, 标有相同大写字母的相互间无极显著差异。

Note: Data in the table followed by the same letters are not significant different at  $\alpha=0.05$  (lowercase) or  $\alpha=0.01$  (capital letter) as determined by Duncan's LSR test.



A: 中油 821 Zhongyou 821; B: 德油 5 号 Deyou 5; C: 皖油 14 Wanyou 14; D: 杂优 1 号 Zayou 1

图 1 不同油菜品种对油菜菌核病菌 (NG4) 的抗性比较

Figure 1 Comparison in resistance of different rapeseed varieties to *Sclerotinia sclerotiorum* (NG4)

### 2.2 不同油菜品种丙二醛含量的变化

由图 2 可以看出,在未接种叶片中,不同抗、感病品种丙二醛(MDA)含量有差异,感病品种略高于抗病品种,但与其抗病性没有显著的相关性。接种后 MDA 在不同抗、感病品种中均升高,但感病品种增加的快、积累的多,显著高于抗病性品种。抗病品种有 2 个波谷,而感病品种只有 1 个。MDA 的含量与供试油菜的抗病性呈负相关。强致病力菌株 NG4 诱导产生的 MDA 量显著高于弱致病力菌株 WW2。说明致病力越强的菌株对油菜的危害越大。草酸处理的 MDA 含量变化与核盘菌保持一致。

### 2.3 不同油菜品种脯氨酸含量的变化

测定结果(图 3)表明,在未接种叶片中,不同抗、感病品种脯氨酸(Pro)含量不同,抗病品种显著高于感病品种。接种后 Pro 含量在不同抗、感病品种中均升高,抗病品种其 Pro 在接种后 72 h 达到最大值,感病品种感病后 24 h Pro 含量增至最大值,抗病品种的含量上升迅速且显著高于感病品种。弱致病力菌株 WW2 比强致病力菌株 NG4 诱导产生的 Pro 含量少且达到差异显著。草酸处理的变化趋势与核盘菌保持一致。

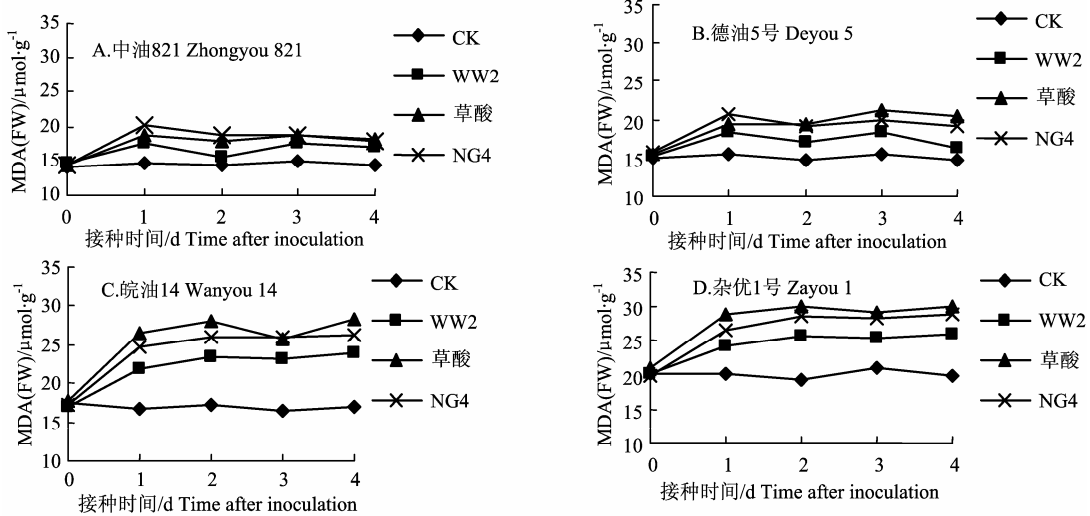


图 2 草酸处理和接种核盘菌后 4 个品种叶片中 MDA 含量的变化

Figure 2 The dynamics of MDA content in the leaves of four varieties of rape after oxalic acid treatment and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*

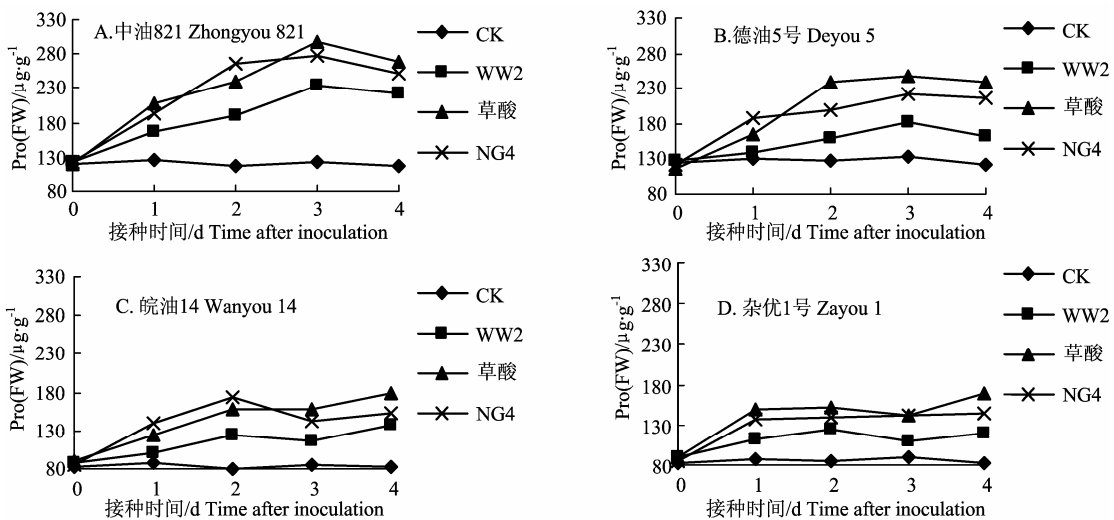


图 3 草酸处理和接种核盘菌后 4 个油菜品种叶片中脯氨酸含量的变化

Figure 3 The dynamics of Pro content in the leaves of four varieties of rape after oxalic acid treatment and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*

### 2.4 不同油菜品种可溶性糖含量的变化

由图 4 可以看出,在未接种叶片中,不同抗、

感病品种可溶性糖含量差异不显著。接种后可溶性糖含量均先升高后降低的趋势,感病品种的增加量

大于抗病品种的增加量。感病品种叶片中可溶性糖含量显著升高, 而抗病品种在接种后变化较小; 并且感病品种中可溶性糖含量持续高于抗病品种。各品种接种致病力强的菌株 NG4 后, 可溶性糖的含量

高于致病力弱的菌株 WW2, 在 48 h 时, WW2 接种的抗性品种可溶性糖含量已低于对照。说明致病力强的菌株能够诱导产生更多的可溶性糖, 降低植株的抗性。

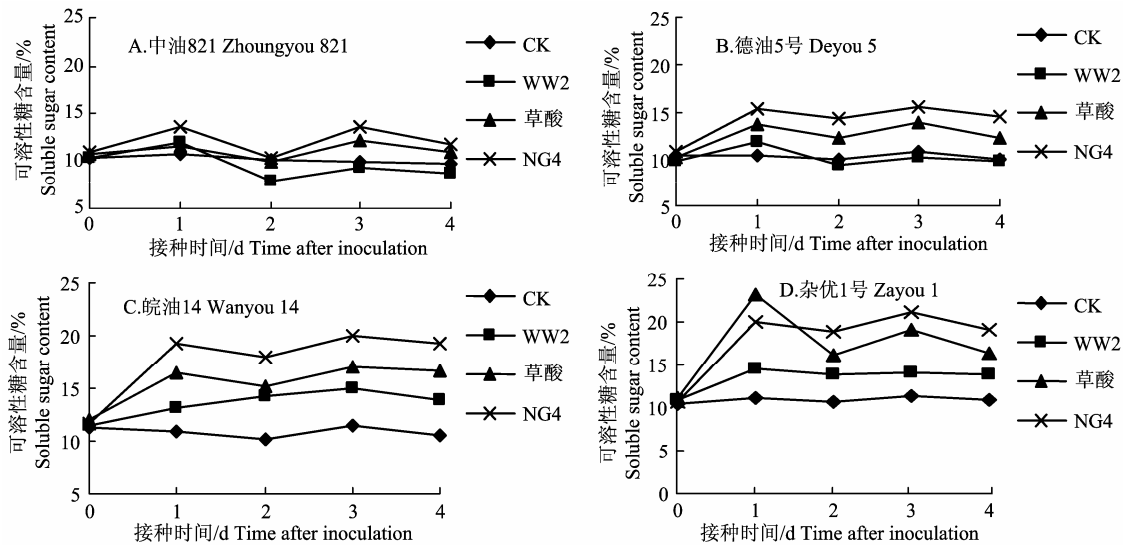


图 4 草酸处理和接种核盘菌后 4 个油菜品种叶片中可溶性糖含量的变化

Figure 4 The dynamics of soluble sugar content in the leaves of four varieties of rape after oxalic acid treatment and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*

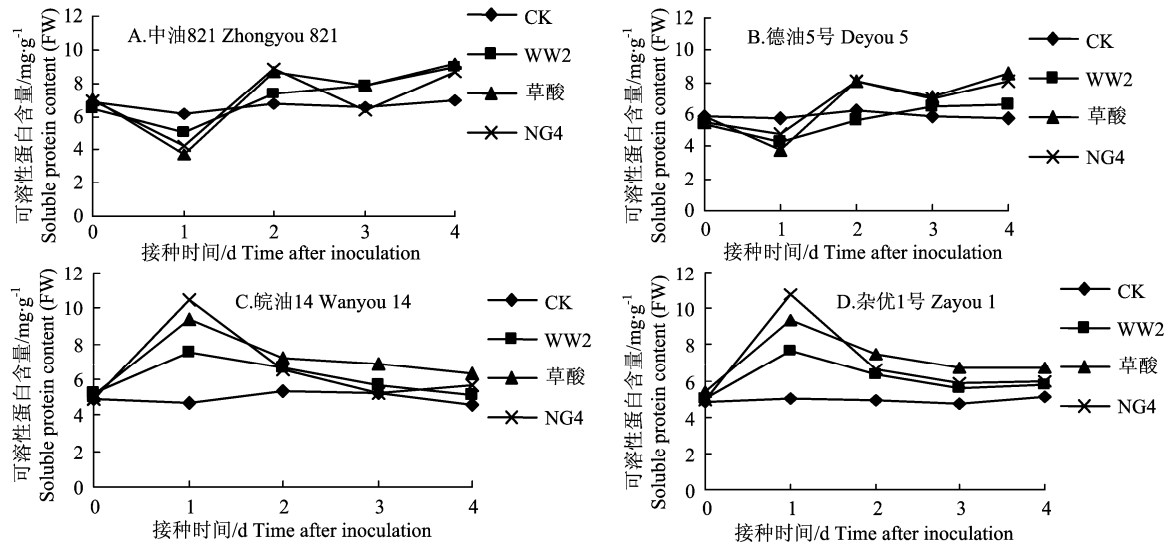


图 5 草酸处理和接种核盘菌后个品种叶片中可溶性蛋白含量的变化

Figure 5 The change of soluble protein content in the leaves of four varieties of bacteria after oxalic acid treatment and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*

## 2.5 不同油菜品种可溶性蛋白含量的变化

测定结果 (图 5) 显示, 在未接种叶片中, 抗性品种可溶性蛋白含量略高于感病品种。接种后, 抗病品种呈先下降后上升的趋势, 而感病品种先上升后下降。感病品种蛋白质含量高峰出现的时间较抗病品种早, 其峰值也大于抗病品种。表明品种抗

性越强, 其体内的可溶性蛋白含量积累的速度越慢且增加量越小。各品种接种致病力强的菌株 (NG4) 后, 可溶性蛋白的含量较致病力弱的菌株 (WW2) 下降或上升的幅度大, 说明致病力强的菌株使植株内可溶性蛋白积累的速度快且增加量越大。草酸处理的变化趋势与核盘菌保持一致。

### 3 小结与讨论

#### 3.1 丙二醛含量与油菜抗病性

研究表明,不同油菜品种 MDA 含量及其变化幅度与其自身的抗病性呈负相关,与核盘菌致病力大小呈正相关。其原因可能是丙二醛(MDA)是细胞膜脂过氧化作用的产物之一,它的产生还能加剧膜的损伤,并抑制细胞保护酶的活性<sup>[15]</sup>。感病品种在接种后 MDA 积累的多,其生物膜损伤程度也大,对病菌的抗性也降低了。抗性品种也许一些生理活性物质或其防御酶系及早发挥作用,故在接种后,丙二醛含量增加的少,引起的生物膜损伤的程度也小,增加了其抗性<sup>[16]</sup>。核盘菌致病力越强,分泌的草酸毒素越多,造成的伤害大,积累的 MDA 含量多。

#### 3.2 脯氨酸含量与油菜抗病性

试验结果显示,不同油菜品种 Pro 含量及增加幅度与其抗病性呈正相关;与核盘菌致病力大小也呈正相关。其原因可能是 Pro 能维持细胞结构、细胞运输和调节渗透压防止细胞脱水。对维持酶的正常活性及细胞膜透性、稳定蛋白特性具有重要作用<sup>[17]</sup>。植物体内 Pro 含量在一定程度上反映植物的抗病性,抗病性强的品种往往在受侵染情况下能够迅速积累较多的 Pro,起到抵御病菌侵入的作用<sup>[18]</sup>。感病品种 Pro 积累的少,故抗病性弱,且发病快,病斑出现的早。

#### 3.3 可溶性糖与油菜抗病性

本研究结果显示,不同油菜品种可溶性糖含量与供试油菜的抗病性呈负相关,与核盘菌致病力大小呈正相关。可溶性糖含量先升高后降低其原因可能是核盘菌的侵染和扩展会分解植物的细胞壁为其提供能量,从而使可溶性糖含量增多。受侵染后,感病品种受破坏程度大,故其可溶性糖增加幅度较抗性品种大。接着可溶性糖被核盘菌利用,以及受侵染后植物呼吸作用加强,光合速率降低,合成下降,以及合成木质素和植保素的消耗等导致可溶性糖含量的降低。

#### 3.4 可溶性蛋白与油菜抗病性

本研究结果还表明,油菜品种的抗性与可溶性蛋白的含量密切相关。抗病品种可溶性蛋白含量的下降可能是由于病原菌的侵染促进了可溶性蛋白的降解,降解后的可溶性蛋白参与了植株抗病生化反应以及抗病物质的合成。如莽草酸途径,这一途径有利于一些抗性物质(如木质素)的产生。而感病品种可溶性蛋白含量的增加表明病原菌的侵染促进了

植物体内的氮代谢,这一途径有利于病原菌的复制从而降低了植株的抗性。这同郑翠明<sup>[9]</sup>等得出的研究结果基本一致。致病力强的菌株使植株内可溶性蛋白积累的速度快且增加量大。也可能由于致病力强的菌株可以分泌更多的草酸毒素,从而抑制寄主部分抗性蛋白的活性。

#### 参考文献:

- [1] 陈晓芳. 油菜菌核病发生规律研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 598.
- [2] 双桑, 阮颖, 彭东平, 等. 油菜菌核病及抗病育种研究进展[J]. 作物研究, 2006(5): 552-556.
- [3] Stephen G C, Valerie E S, Martin B D, et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum* suppresses the oxidative burst of the host plant[J]. Plant Cell, 2000, 12(11): 2191-2200.
- [4] Rejane L, Guimaraes H, Henrik U, et al. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection [J]. Plant Physiology, 2004, 136: 3703- 3711.
- [5] 毛玮, 侯英敏, 刘志文. 核盘菌和草酸诱导下的油菜几种酶活力的变化分析[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(1): 39-42.
- [6] 庄炳昌. 接种大豆花叶病毒后大豆叶超氧化物歧化酶、过氧化物酶和蛋白组分的变化[J]. 作物学报, 1993, 23(3): 261-265.
- [7] 梁艳荣, 胡晓红. 大葱抗感紫斑病品种生理特性研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 169-172.
- [8] 陆京杰, 陈永营. 大豆花叶病毒的侵染对大豆碳氮代谢的影响[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17(2): 43-47.
- [9] 郑翠明, 滕冰, 高凤兰, 等. 不同种粒抗性大豆品种感染 SMV 后可溶性蛋白和游离氨基酸的研究[J]. 植物病理学报, 1998, 28(3): 227-231.
- [10] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
- [11] 凌萍, 高宁馨, 高智谋, 等. 油菜菌核病菌不同致病力菌株生物学特性的比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(6): 916-919.
- [12] 孙群, 胡景江. 植物生理学研究技术[M]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006: 176-177.
- [13] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.
- [14] 郝建军, 康宗利, 于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [15] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物一病原物互作中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 377-385.
- [16] 甘莉, 伍新玲, 金良, 等. 甘蓝型油菜抗(耐)菌核病近等基因系的创建及抗病性分析[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2002, 48(6): 761-764.
- [17] 林伟, 牟中林, 吴沿友, 等. 油菜抗羟脯氨酸突变体的筛选[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 1998, 3: 16-19.
- [18] 郭文硕. 锥栗对栗疫病的抗性与氨基酸的关系[J]. 林业科学, 2002, 38(1): 160-163.