

# 枣疯病植原体对枣树叶绿素及几种保护性酶的影响

刘雅倩<sup>1</sup> 彭 龙<sup>1</sup> 宁 强<sup>3</sup> 赵 锦<sup>1</sup> 刘孟军<sup>2</sup>

(1. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071001;

3. 河北政法职业学院 园林系, 河北 石家庄 050061)

**摘要:**以田间患枣疯病树表型健康叶片、花变叶以及疯小叶为材料,健康树叶片为对照,测定了不同生长期各种叶片的叶绿素、可溶性蛋白、丙二醛(MDA)含量及3种保护酶活性,以期揭示植原体对枣树生理代谢的影响。结果表明,患病后叶片叶绿素、可溶性蛋白含量均显著降低,过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及MDA含量升高,多酚氧化酶(PPO)活性差异不显著,不同患病程度的叶片中花变叶变化最显著。这些结果均表明枣疯病植原体侵染枣树后,树体的光合作用和保护酶系统受到明显影响。

**关键词:**枣疯病; 叶绿素; SOD; POD; MDA; PPO; 可溶性蛋白

中图分类号:S432 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0213-05

## Effect of Jujube Witches' Broom( JWB) Phytoplasma on the Chlorophyll and Several Protective Enzymes in Jujube Trees

LIU Ya-qian<sup>1</sup> PENG Long<sup>1</sup> NING Qiang<sup>3</sup> ZHAO Jin<sup>1</sup> LIU Meng-jun<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

3. Gardening Department, Hebei Vocational College of Politics and Law, Shijiazhuang 050061, China)

**Abstract:** The leaves of behaved healthy, leaves changed by flower and tiny leaves with jujube witches' broom (JWB) of *Ziziphus jujuba* cv. Zanzhuangdazao and the leaves of healthy tree as the control were used in this paper. The content of chlorophyll, soluble protein, MDA and three kinds of protective enzymes activity of different leaves at different growth stages were determined to reveal the effect of phytoplasma on jujube physiological metabolism. The results showed that the content of chlorophyll and soluble protein of diseased leaves were significantly lower than that of healthy leaves. The POD, SOD activity and MDA content of diseased leaves were significantly higher than that of healthy leaves. PPO activity was not significantly changed. Leaves changed by flower was the most significantly changed than the other diseased leaves. These results indicated that the photosynthesis and protective enzyme system of diseased trees were significantly affected by jujube witches' broom phytoplasma.

**Key words:** Jujube witches' broom( JWB); Chlorophyll content; SOD; POD; PPO; MDA; Soluble protein

枣树原产我国,目前是我国重要的特色果树和第一大干果树种,枣疯病是生产上发生最普遍、具有毁灭性的传染性检疫病害,国内外枣区均有发生<sup>[1-2]</sup>。多年来,研究者在枣疯病病原的检测、传播、运行规律、防治药物的筛选、抗病品种选育等方面开展了大量研究,在一定程度上降低了发病区疯树发病率<sup>[3-8]</sup>。同时,许多学者也开始从病理生理

学的角度对其进行研究,发现枣树感染植原体后,其激素水平、矿质元素含量以及酚类物质产生了明显的变化<sup>[9-11]</sup>。Kipkpatrick B C<sup>[12-13]</sup>等提出,植原体病害症状发生可能是由于C/N值失调造成的,病叶中P、Zn、Fe、B、Cu、K含量升高,而Mn、Mg、Ca下降等<sup>[14-15]</sup>。但目前对于枣疯病病原侵染枣树后不同患病程度叶片的叶绿素含量、保护酶活性及其蛋白

收稿日期:2011-12-27

基金项目:河北自然科学基金项目(C2009000534;08D020);河北省杰出青年基金项目(C2010000679)

作者简介:刘雅倩(1987-),女,河北霸州人,硕士,主要从事植物资源开发与利用研究。

通讯作者:赵 锦(1977-),女,河北安平人,教授,主要从事植物抗病育种研究。

刘孟军(1965-),男,河北望都人,教授,主要从事枣种质资源研究。

含量变化的研究较少,本试验针对这些方面开展了相关研究,旨在探索枣疯病病原体对枣树光合及保护性酶的影响,为进一步研究枣疯病提供理论基础和实践依据。

## 1 材料和方法

本试验以赞皇大枣为试材,于2010年6月28日、7月17日、8月8日、8月28日在河北省赞皇县许亭村枣园采集3棵完全健康树和3棵枣疯病病树叶片,采样部位为树冠外围没有虫害叶片。每棵树重复3次采样。

叶绿素采用95%乙醇浸提法,参照赵世杰<sup>[16]</sup>的方法。称取枣健康树和枣疯病病树表型健叶、花变叶、疯小叶叶片各0.1g,剪成细丝状置于20mL带刻度试管中,加20mL 95%乙醇避光浸提24h,每样品3次重复,期间不时振荡,待叶片组织彻底变白后,分别在665、649nm下比色测定,根据公式计算叶片中叶绿素含量。 $C_a = 13.95D_{665} - 6.88D_{649}$ ;  $C_b = 24.96D_{649} - 7.32D_{665}$ ; 叶绿素的含量(mg/g) = (叶绿素的浓度 × 提取液体积 × 稀释倍数) / 样品鲜质量。D为测定时吸光值。

SOD活性采用NBT光化学还原法<sup>[17]</sup>; POD活性采用愈创木酚法<sup>[18]</sup>, PPO活性采用李忠光和龚明<sup>[19]</sup>改进的方法测定,MDA含量参照赵世杰等<sup>[20]</sup>改进的方法;可溶性蛋白采用考马斯亮蓝法<sup>[21]</sup>。

利用浙江大学唐启义DPS v3.01软件和Excel对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 枣疯病对枣树叶绿素含量的影响

本试验对健树健叶、枣疯病病树健叶、花变叶及疯小叶4种类型叶片(图1)进行了叶绿素含量测定,结果见图2~4。

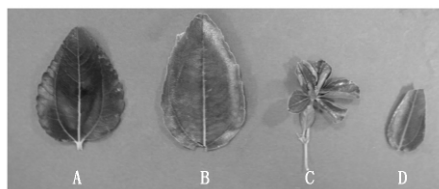


图1 田间健康树叶片(A)与患枣疯病树健叶(B)、花变叶(C)、小叶(D)比较

Fig.1 The comparison of healthy leaf in healthy tree (A) and healthy leaf (B), phyllody (C) and tiny leaf (D) in JWB tree

从图2可看出4种叶片的叶绿素a含量(以鲜质量计)存在显著性差异,生长前期健树健叶中的叶绿素a含量最高,疯小叶最低。健叶和病叶叶绿素a的含量都随生育期的延长呈现先升高再逐渐下

降的趋势,但生长后期健树健叶的叶绿素a下降时病叶却有所升高,而且花变叶的升高幅度最大。

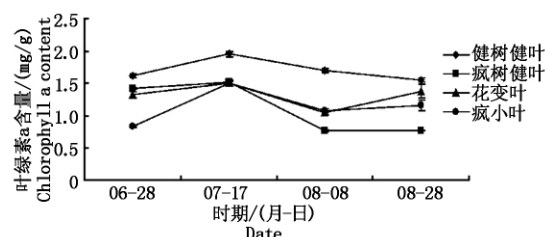


图2 枣疯病对枣树叶绿素a含量的影响

Fig.2 The effect of jujube witches' broom disease on the content of chlorophyll a

从图3可看出4种叶片的叶绿素b(以鲜质量计)含量存在显著性差异,变化趋势基本与叶绿素a一致。在生长后期,病树叶片叶绿素b含量均有所回升而健树健叶含量一直下降。

综合叶绿素a和b的变化趋势可以看出,在生长后期健树健叶叶绿素含量随物候期逐渐下降时,病树叶片的叶绿素含量却有所回升,极有可能是与冬季病树病叶依然保持良好的生长态势,不能正常脱落有关。而花变叶的升高幅度最大则可能与它在器官上的转变相关。

从图4可看出,健树健叶的叶绿素a/b值高于病叶,并随生育期的延长呈现基本稳定的趋势;疯小叶的叶绿素a/b值随生育期的延长呈现先升高而后缓慢降低的趋势。此结果说明,患病程度越重,叶绿素a/b值越小,也就是叶绿素a含量越少。

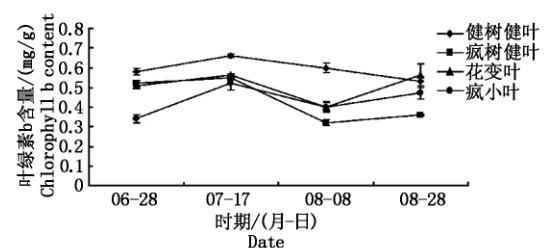


图3 枣疯病对枣树叶绿素b含量的影响

Fig.3 The effect of jujube witches' broom disease on the content of chlorophyll b

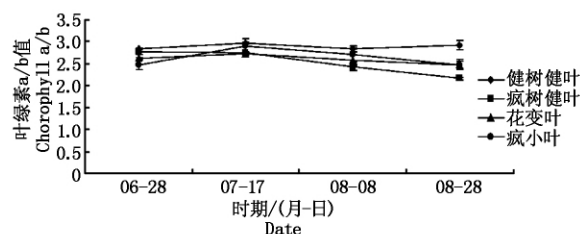


图4 枣疯病对枣树叶绿素a/b值的影响

Fig.4 The effect on the chlorophyll a/b with jujube witches' broom disease

### 2.2 枣疯病对枣树保护酶活性的影响

#### 2.2.1 枣疯病对枣树SOD酶活性的影响 对健树

健叶、枣疯病病树健叶、花变叶及疯小叶进行了 SOD 酶活性(以鲜质量计)测定 结果见图 5。

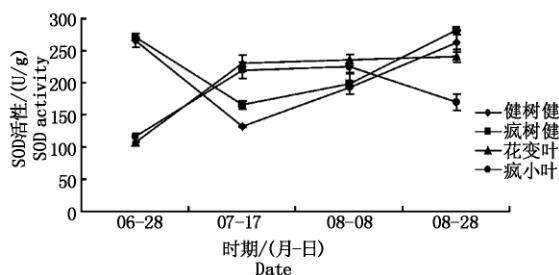


图 5 枣疯病对枣树 SOD 活性的影响

Fig. 5 The effect on the activity of SOD with jujube witches' broom disease

从图 5 可看出,健康叶片与病叶的 SOD 活性在各个时期都有显著差异。在生长初期和后期,健树健叶与疯树健叶无差异,但与花变叶和疯小叶 SOD 活性差异显著。健树健叶和疯树健叶随生育期的延长呈现先下降再升高的趋势,而疯树花变叶和小叶则相反,呈现先升高再下降的趋势。

2.2.2 枣疯病对枣树 POD 酶活性的影响 对健树健叶、枣疯病病树健叶、花变叶及疯小叶进行了 POD 酶活性(以鲜质量计)测定 结果见图 6。

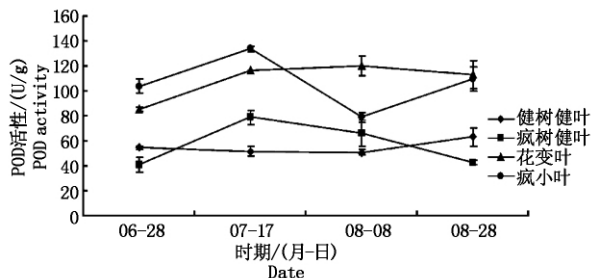


图 6 枣疯病对枣树 POD 活性的影响

Fig. 6 The effect on the activity of POD with jujube witches' broom disease

从图 6 可看出,在不同时期不同患病程度叶片中的 POD 活性差异显著。生长前期,疯树小叶的 POD 活性最高,其次是花变叶、疯树健叶和健树健叶。相对而言,患病程度较重之花变叶和疯树小叶 POD 活性一直处于较高水平,高于同时期的健树健叶和疯树健叶 POD 活性。此结果说明病原侵染对 POD 活性影响较大,而且病原浓度越大、症状越重,对 POD 活性影响越大。

2.2.3 枣疯病对枣树 PPO 酶活性的影响 对健树健叶、枣疯病病树健叶、花变叶及疯小叶进行了 PPO 酶活性(以鲜质量计)测定 结果见图 7。

从图 7 可看出 4 种叶片中 PPO 活性在生长初期差异显著,其中,疯树小叶和花变叶中 PPO 活性最高,随后下降,在生长后期各个处理间差异不显著。说明在病原侵染初期,病树体内的 PPO 活性

显著增加,以抵御病原伤害,而后随着病原持续侵染,这种作用在逐渐减弱。

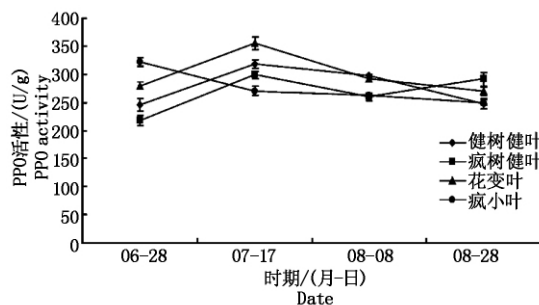


图 7 枣疯病对枣树 PPO 活性的影响

Fig. 7 The effect on the activity of PPO with jujube witches' broom disease

## 2.3 枣疯病对枣树 MDA 含量的影响

对健树健叶、枣疯病病树健叶、花变叶及疯小叶进行了 MDA 含量(以鲜质量计)测定 结果见图 8。

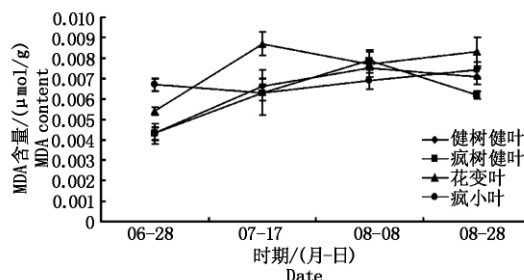


图 8 枣疯病对枣树 MDA 含量的影响

Fig. 8 The effect on the content of MDA with jujube witches' broom disease

从图 8 可看出 4 种叶片中 MDA 含量在生长初期差异显著,其中,花变叶中 MDA 含量在 7 月份最高,与其他 3 种叶片差异显著,而且在生长后期花变叶的 MDA 含量也最高。分析原因有可能与花变叶属于花器官的发育出现异常有关。

## 2.4 枣疯病对枣树可溶性蛋白含量的影响

对健树健叶、枣疯病病树健叶、花变叶及疯小叶进行了可溶性蛋白含量(以鲜质量计)的测定,结果见图 9。

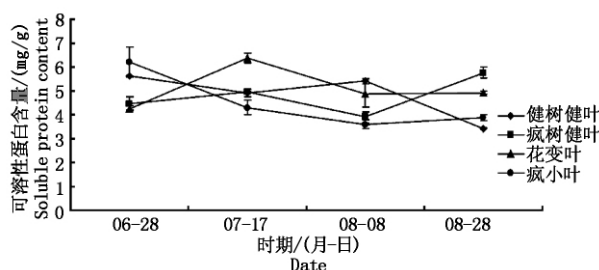


图 9 枣疯病对枣树可溶性蛋白含量的影响

Fig. 9 The effect on the content of soluble protein with jujube witches' broom disease

从图 9 可看出,生长初期,病树小叶的蛋白含量最高,花变叶的最低;生长中期,花变叶的蛋白含量

升高,疯小叶蛋白含量逐渐降低且显著低于其他各处理。花变叶蛋白含量升高可能与花器官的性质改变有关,而疯小叶蛋白含量逐渐降低可能与病原浓度持续较高有关。

### 3 讨论

光合作用是衡量植物合成功能的重要生理指标,而叶绿素是植物光合作用的基础,当病原物侵染植物后往往能与叶绿体发生相互作用导致叶绿体的解体,使叶绿素合成受阻出现叶片褪绿、黄化或花叶等症状。李玥仁等<sup>[22]</sup>报道,条锈菌侵染小麦后叶片叶绿素含量明显下降;葡萄感染白粉病后其叶绿素含量显著降低<sup>[23]</sup>;徐秉良等<sup>[24]</sup>研究表明,苜蓿感染白粉病后叶绿素含量随发病程度的增加而显著降低。本研究发现,受到植原体侵染后枣树病树病叶的叶绿素 a、b 及其比值都显著低于健树健叶;张丽君等<sup>[25]</sup>研究也表明,枣疯病疯树的净光合速率远远低于正常树水平。本研究还发现,不同患病程度的病叶中疯树健叶的叶绿素含量下降最快,生长后期疯树小叶和花变叶的叶绿素含量都有不同程度的提高,分析这可能与病枝疯树小叶和花变叶一直保持旺盛的丛生状态有关。

SOD、CAT 和 POD 等酶类是细胞抵御活性氧伤害的重要保护酶系统,它们在清除超氧自由基、过氧化氢和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面起着重要作用。张淑红等<sup>[26]</sup>等研究表明,不发病的枣树 POD 活性低于发病的。宋淑梅等<sup>[27]</sup>研究表明,患枣疯病病株各不同器官中的过氧化物酶活性显著高于健株。本研究结果表明,病叶的 POD 活性显著高于健叶,这与前人的研究结果相一致。SOD 活性病叶也比健叶有不同程度的提高,POD 活性只有花变叶略高于健叶,其他叶片变化并不明显。同时发现,病原对小叶和花变叶中的酶影响最大,表明了患病程度越严重其酶活性越高。

丙二醛(MDA)作为膜脂过氧化产物,其含量可以反映细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱。一般逆境程度越大,膜脂过氧化越严重,MDA 含量就越高。本研究表明,在病原侵染后,只有花变叶的显著高于健叶,说明枣疯病植原体对花变叶的膜脂过氧化程度影响严重。

蛋白质作为生命活动的体现者,它的含量、特征以及变化是由植物发育进程所决定的,植物对胁迫反应的结果,必然会在蛋白质含量和组成上有所体现。赵进红等<sup>[28]</sup>研究表明,植原体侵染后,枣树蛋白质含量出现不同程度的下降。本研究表明,疯树

健叶和疯小叶的可溶性蛋白都低于健树健叶,但花变叶的蛋白含量在生长前期却高于健叶,这可能与花器官由生殖生长转变为营养生长有关。

从叶绿素、酶类、蛋白含量的一系列变化中可看出,当枣疯病植原体侵入后树体内发生了一系列的生理生化变化。而针对不同患病程度的叶片来看,病原对花变叶和疯小叶的影响最明显,各项指标变化都较大,也说明了患病程度越严重树体内生理变化越显著,而花变叶所表现出来的特殊性与病原侵染使生殖器官转变为营养器官有很大关系。赵锦等<sup>[29]</sup>研究表明,七、八月份是枣疯病发病的高峰时期,病原浓度最大。本试验中涉及的指标也基本是在此期间变化最明显,可以看出,病原浓度与发病程度及其对生理代谢的影响呈正相关。因此,就某一病害来说,今后明确不同侵染时期、不同患病程度下体内各种酶以及代谢物质的变化动态、机制及其相关性,是进行病害生理研究的基础。

### 参考文献:

- [1] 刘仲健,罗焕亮,张景宁.植原体病理学[M].北京:中国林业出版社,1999:1-37.
- [2] 潘青华.枣疯病研究进展及防治措施[J].北京农业科学,2002(3):4-8,21.
- [3] 薛渝峰.植原体诱导下抗枣疯病相关基因的差异表达研究[D].保定:河北农业大学,2008.
- [4] 田国忠,朱永芳,张成良.植原体分类和鉴定新动向.见:彭于发,等.植物病理学研究[M].北京:中国农业出版社,1997:9-13.
- [5] 张淑红.枣疯病的抗病生理机制研究[D].保定:河北农业大学,2004.
- [6] 徐秀德,李项宇,董怀玉,等.枣疯病药剂防治技术初报[J].辽宁农业科学,2004(4):19-21.
- [7] 赵锦,代丽,薛陈心,等.离体条件下进行治疗枣疯病药物筛选的可行性研究[J].河北农业大学学报,2006(1):70-73.
- [8] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16: 157-173.
- [9] 赵锦.枣疯病病原分布消长规律及其病害生理研究[D].保定:河北农业大学,2003.
- [10] 宋淑梅,宋东辉,史建伟,等.同工酶与枣疯病病理变化的关系[J].林业科学研究,2000,13(专):106-113.
- [11] 赵锦,刘孟军,代丽,等.枣疯病病树中内源激素的变化研究[J].中国农业科学,2006,39(11):2255-2260.
- [12] 范国强,冯志敏,瞿晓巧,等.植物生长调节物质对泡桐丛枝病株幼苗形态和叶片蛋白质含量变化影响

- [J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(2): 137 - 141.
- [13] Kirkpatrick B C, Stenger D C, Morris T J *et al.* Cloning and detection of DNA from an unculturable plant pathogenic mycoplasma like organism [J]. Science, 1987, 238: 197 - 200.
- [14] 周俊义, 刘孟军, 侯保林. 枣疯病研究进展 [J]. 果树科学, 1998, 15(4): 354 - 359.
- [15] 潘青华. 枣疯病研究进展及防治措施 [J]. 北京农业科学, 2002(3): 4 - 8.
- [16] 赵世杰. 叶绿素的定量测定 [M] // 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2000: 72 - 75.
- [17] 李柏林, 梅慧生. 燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系 [J]. 植物生理学报, 1989, 15(1): 6 - 12.
- [18] 张宪政. 作物生理研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [19] 李忠光, 龚明. 植物多酚氧化酶活性测定方法的改进 [J]. 云南师范大学学报, 2005, 25(1): 44 - 49.
- [20] 赵世杰, 许长城, 邹琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207 - 210.
- [21] 白宝璋, 靳占忠, 李存东. 植物生理学实验教程下 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 73 - 74.
- [22] 李玥仁, 商鸿生. 条锈菌侵染对小麦光合作用和蒸腾作用的影响 [J]. 麦类作物学报, 2001, 21(2): 51 - 56.
- [23] 王旭, 赵思东, 傅海军. 湘潭地区欧亚葡萄品种的优选研究 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2004(3): 54 - 57.
- [24] 徐秉良, 李敏权, 郁继华, 等. 苜蓿对白粉病抗性与叶绿素含量的关系 [J]. 草业科学, 2005, 22(4): 72 - 74.
- [25] 张丽君, 冯殿齐, 王玉山, 等. 枣疯病病树光合特性的初步研究 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2010, 30(2): 130 - 132.
- [26] 张淑红, 高宝嘉, 温秀军. 枣疯病过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的研究 [J]. 植物保护, 2004, 30(5): 59 - 62.
- [27] 宋淑梅, 张中慧, 宋东辉, 等. 枣疯病与过氧化物酶活性变化的研究 [J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(2): 131 - 134.
- [28] 赵进红, 王玉山, 冯殿齐, 等. 药物处理对疯枣枝过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶活性的影响 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2010, 41(3): 360 - 364.
- [29] 赵锦, 刘孟军, 周俊义, 等. 枣疯植原体的分布特点及周年消长规律 [J]. 林业科学, 2006, 42(8): 144 - 146.