

黄瓜组织中几种酶活性与其* 对霜霉病抗性的关系

云兴福 崔世茂 霍秀文

(内蒙古农牧学院园艺系, 呼和浩特 010018)

摘 要 对抗、感霜霉病两类黄瓜品种的萌动种子、子叶、不同叶位真叶及定位叶片感染霜霉病菌后叶内超氧化物歧化酶 (SOD)、多酚氧化酶 (PPO) 和过氧化物酶 (POD) 活性的测定结果表明: 抗病品种比感病品种萌动种子中的 SOD 活性高 54.15%、PPO 活性高 62.14%; 子叶中的 SOD 活性高 35.51%, PPO 活性高 40.10%, POD 活性高 74.47%; 不同叶位真叶内, 除 SOD 活性为感病品种高于抗病品种 131.52% 外, PPO、POD 活性仍分别高于感病品种 12.93% 和 28.76%; 定位叶片接种感染霜霉菌后, 随接种时间的延续, PPO 活性降低, 而 POD 活性增加, SOD 活性呈先降后升趋势, 但前两种酶活性始终是抗病品种高于感病品种, 与抗病性呈正相关, SOD 活性始终是感病品种高于抗病品种, 与抗病性呈负相关。

关键词 黄瓜组织 酶活性 霜霉病 抗性

不同黄瓜品种, 同一植株在不同时期 (不同株龄) 和不同叶位 (不同叶龄) 的叶片对霜霉病的抗性有很大差异^[1], 其生理生化机理目前尚不清楚。笔者曾对黄瓜组织中糖、叶绿素、氨基酸种类和含量、氢离子浓度和氧化还原电位与其对霜霉病抗性的关系进行了研究^[2,3]。关于多酚氧化酶和过氧化物酶与抗病性的关系国内有少数文献有报道^[4], 但超氧化物歧化酶 (SOD) 活性与抗黄瓜霜霉病的关系方面的研究未见有报道。

试验拟通过对黄瓜抗、感霜霉病两类 6 个品种的萌动种子、子叶、不同叶位真叶及定位叶片感染霜霉病菌后叶内 SOD、多酚氧化酶和过氧化物酶活性的分析测定, 找出各种酶活性与黄瓜叶片对霜霉病抗性的关系。

1 材料和方法

试验于 1993 年在本院试验研究中心和蔬菜教学基地的日光温室内进行。

1.1 供试黄瓜品种

供试感病品种为在本地区对霜霉病高感的山东密刺、长春密刺和新泰密刺; 抗病品种为津研 2 号、津研 4 号和津研 7 号。

1.2 试样准备

1.2.1 萌动种子 各品种浸种 6h, 取出后在室温下萌动 24h, 每品种 50 粒, 去种皮, 3 次重

1994-11-05 收稿。

*内蒙古科委资助项目。

复, 称取所需克数的样品。

1.2.2 子叶 种子浸种催芽后, 播于装有炉灰渣(直径 3~5mm)的苗盘内, 待子叶充分展大后, 5 点法取样 20 株, 剪碎混匀, 称取所需克数的样品, 3 次重复。

1.2.3 不同叶位真叶 将育好的 3 叶 1 心的津研 2 号和山东密刺秧苗, 以 50cm×35cm 的密度定植于日光温室内, 常规管理, 待第 8 片叶宽 10cm 时, 每处理一次性取 15 株的第 1、第 4 和第 7 叶位的真叶, 充分剪碎混匀, 称取所需克数的样品, 3 次重复。

1.2.4 接种霜霉病菌的定位真叶 将津研 2 号和山东密刺两品种的子苗分于装有园土的钵内, 待长出第 4 真叶时, 用配成浓度为 3.979×10^5 个孢子囊/ml 的菌液(取温室中的霜霉病叶, 洗去表面菌丝后, 置于培养皿内, 叶片上下覆盖湿润的吸水纸, 然后放在 24℃、4000 lx 荧光的生长箱内培养 48h, 长出新的菌丝和孢子囊, 用蒸馏水冲洗配成)全株喷雾接种, 特别注意在第 2 叶位叶片上接种, 以充分喷湿叶面为度。接种后将植株放在塑料温室内, 并扣地膜小棚保温保湿。每处理 60 株, 3 次重复。然后分别取接种前、接种后 48h、96h 和 144h 的第二叶位叶片, 每样取 15 株(即 15 株的第二叶位叶片), 剪碎混匀, 称取所需克数。测定酶活性。

1.3 酶活性测定方法

1.3.1 SOD 活性测定方法 参照王爱国^[5]的方法, 利用 SOD 抑制氮蓝四唑(NBT)在荧光下的还原作用。酶液提取: 称取充分混匀的碎叶片切段 0.25g, 加 5mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.8)冰浴条件下研磨, 在 20000 r/min 下离心 20min, 上清液即为酶提取液。

活性测定: 3ml 反应混合液中含有: 1.3μM 核黄素, 13mM 甲硫氨酸, 63mM NBT, 0.05M pH=7.8 磷酸缓冲液, 加 30μl 酶液, 置于 4000lx 荧光下, 温度 25℃, 反应 10min, 然后用黑暗终止反应, 立即在 560nm 下比色, 测定光密度, 以缓冲液代替酶液做空白, 酶活单位采用抑制 NBT 光化还原的百分数或用 NBT 光化还原 50% 为一个酶活单位表示。

1.3.2 多酚氧化酶、过氧化物酶活性测定 酶液提取: 参照李靖等^[4]的方法。取 6 个品种的相应组织, 分别称取鲜重 0.2g, 加 0.4ml 蒸馏水, 在冰浴中(-5℃)研磨, 离心 5min (5000r/min), 取上清液置冰箱中保存, 用于多酚氧化酶、过氧化物酶活性测定。

多酚氧化酶活性测定: 在小试管中依次加入 0.2M 邻苯二酚溶液 1.5ml, 0.05M pH=6.8 磷酸缓冲液 1.5ml, 酶液 0.01ml, 另取一小试管, 加前两种溶液, 不加酶液, 作为对照。在 30℃ 下反应 2min, 398nm 波长下测吸光值(OD 值)。酶活单位用 $\Delta OD \text{ 值} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ 鲜重} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

过氧化物酶活性测定: 在小试管中依次加入 0.2M pH=5.0 磷酸缓冲液 1.95ml, 0.1% 邻甲氧苯酚 1ml, 酶液 0.05ml, 0.08%, H_2O_2 溶液 0.5ml, 而对照即将过氧化氢溶液改为 0.5ml 蒸馏水, 从加入 H_2O_2 的时刻计时, 在 60min 时 470nm 波长下测定 OD 值, 酶活单位以 $\Delta OD \text{ 值} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ 鲜重} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 萌动种子的几种酶活性

2.1.1 SOD 酶活性 在萌动种子中, 抗病品种的 SOD 酶活性高于感病品种, 是其 1.5415 倍(表 1)。

表 1 不同品种萌动种子中 SOD 活性

品 种	OD ₁	OD ₂	OD ₃	平均	酶活性	酶活平均	抗/感
空白对照	0.179	0.191	0.169	0.1797			
津研 2 号	0.120	0.129	0.111	0.1200	442.96		
津研 4 号	0.114	0.126	0.106	0.1153	477.84	436.53**	
津研 7 号	0.129	0.127	0.126	0.1273	388.80		
长春密刺	0.139	0.156	0.146	0.1470	242.63		1.5415
山东密刺	0.145	0.143	0.139	0.1423	277.50	283.19	
新泰密刺	0.136	0.135	0.135	0.1353	329.44		

注：酶活单位：一个酶活单位定义为能引起反应初速度（指不加酶时）半抑制的用酶量。

2.1.2 多酚氧化酶活性 在萌动种子中，抗病品种的多酚氧化酶活性高于感病品种，是其 1.6214 倍（表 2）。

表 2 不同品种萌动种子中 PPO 活性

品 种	OD ₁	OD ₂	OD ₃	平均	酶活性	酶活平均	抗/感
津研 2 号	0.062	0.064	0.061	0.0623	0.0156		
津研 4 号	0.078	0.084	0.074	0.0787	0.0190	0.0167	
津研 7 号	0.058	0.064	0.065	0.0623	0.0156		
长春密刺	0.034	0.044	0.050	0.0427	0.0107		1.6214
山东密刺	0.029	0.041	0.044	0.0380	0.0095	0.0103	
新泰密刺	0.046	0.031	0.051	0.0427	0.0107		

注：酶活单位：△OD·mg⁻¹鲜重·min⁻¹（表 3~表 7 同）。

2.2 子叶的几种酶活性

2.2.1 SOD 活性 子叶内 SOD 活性也是抗病品种高于感病品种，抗病品种是感病品种的 1.3551 倍（表 3）。

表 3 不同品种子叶中 SOD 活性

品 种	OD ₁	OD ₂	OD ₃	平均	酶活性	酶活平均	抗/感
空白对照	0.121	0.139	0.147	0.1357			
津研 2 号	0.071	0.089	0.082	0.0817	537.46		
津研 4 号	0.079	0.082	0.087	0.0827	517.81	537.46**	
津研 7 号	0.074	0.084	0.079	0.0790	557.11		
长春密刺	0.091	0.091	0.094	0.0920	429.38		1.3551
山东密刺	0.101	0.106	0.092	0.0997	350.78	396.63	
新泰密刺	0.100	0.101	0.080	0.0937	409.73		

2.2.2 多酚氧化酶活性 子叶内多酚氧化酶活性抗病品种是感病品种的 1.60 倍，差异极显著（表 4）。

表 4 不同品种子叶中 PPO 活性

品 种	OD ₁	OD ₂	OD ₃	平均	酶活性	酶活平均	抗/感
津研 2 号	0.045	0.044	0.030	0.040	0.0040		
津研 4 号	0.039	0.030	0.039	0.036	0.0036	0.0040**	
津研 7 号	0.041	0.042	0.050	0.043	0.0043		
长春密刺	0.026	0.025	0.024	0.025	0.0025		1.6000
山东密刺	0.034	0.021	0.030	0.028	0.0028	0.0025	
新泰密刺	0.025	0.023	0.021	0.023	0.0023		

2.2.3 过氧化物酶活性 子叶内过氧化物酶活性抗病品种是感病品种的 1.7447 倍。

表 5 不同品种子叶中 PO 活性

品 种	OD ₁	OD ₂	OD ₃	平均	酶活性	酶活平均	抗/感
津研 2 号	0.341	0.372	0.364	0.359	0.0719		
津研 4 号	0.475	0.363	0.391	0.410	0.0820	0.082**	
津研 7 号	0.435	0.466	0.482	0.460	0.0921		
长春密刺	0.195	0.194	0.174	0.188	0.0375		1.7447
山东密刺	0.206	0.174	0.176	0.185	0.0371	0.047	
新泰密刺	0.300	0.345	0.344	0.330	0.0660		

2.3 不同叶位真叶的几种酶活性

表 6 不同叶位真叶中 SOD、PPO、POD 酶活性

酶 种 类	第一真叶		第四真叶		第七真叶		平 均	
	山东密刺	津研 2 号	山东密刺	津研 2 号	山东密刺	津研 2 号	山东密刺	津研 2 号
SOD 活性	241.712 **	95.517	176.133 **	79.013	277.779 **	125.927	231.876 **	100.152
PPO 活性	0.0140	0.0150 *	0.0142	0.0161 *	0.0067	0.0083 *	0.0116	0.0131 *
POD 活性	0.207	0.232 **	0.172	0.229 **	0.062	0.107 **	0.147	0.189 **

就同一品种植株的不同叶位来说，多酚氧化酶和过氧化物酶活性表现为中、老叶高，幼叶低，而 SOD 活性则为老、幼叶高，中龄叶低。

就抗病和感病两类品种来说，每个叶位多酚氧化酶、过氧化物酶活性均为抗病品种高于感病品种，各叶位平均差异达到极显著 ($\alpha=0.01$) 水平。而每个叶位 SOD 酶活性则是感病品种极显著高于抗病品种，其酶活性与其在萌动种子、子叶中的表现趋势不一致，其原因尚需进一步试验研究。

2.4 定位真叶接种霜霉病菌后的酶活性

表 7 定位真叶接种霜霉病菌后的病指数及酶活性

项 目	品 种	接种前	接后 48h	接后 96h	接后 144h
病情指数	山东密刺	0	0.0332	0.1432	0.1618 **
	津研 2 号	0	0.0093	0.0694	0.0930
SOD 活性	山东密刺	469.366	258.127	211.221	567.379 **
	津研 2 号	359.366	327.404	272.607	393.620
PPO 活性	山东密刺	0.0073	0.0060	0.0053	0.0040
	津研 2 号	0.0086	0.0068	0.0058	0.0050 *
POD 活性	山东密刺	0.1479	0.1579	0.1776	0.1820
	津研 2 号	0.1605	0.1643	0.1881	0.1940 **

定位叶接种霜霉菌后，叶片病指数随接种时间的延后而呈递增趋势。但津研 2 号的病指数比山东密刺的病指数低 71.99%~42.52%。SOD 活性在接种后 96h 内连续降低，感病品种降低更快，到 144h 时迅速提高，但抗病品种提高的速度远不及感病品种，最终感病品种酶活性显著高于抗病品种。多酚氧化酶活性随病指数的增加呈递减趋势；过氧化物酶活性则随病指数的增加呈递增趋势，这两种酶活性在接种后的各时期抗病品种均显著或极显著高于感病品种（表 7）。

3 讨论

3.1 SOD 酶活性与叶片对霜霉病免疫性能的关系

SOD 在好气细胞呼吸中十分重要，它能催化超氧化物阴离子自由基 ($\cdot O_2^{\cdot 1}$) 的歧化作用成为分子氧和过氧化氢。Mocord 和 Fridorich (1969) 发现酶活性以来，已证明它在动植物中普遍存在^[5]。由于酶分子中所含的金属离子不同，其生理功能也不相同^[5]。关于 SOD 活性与各种植物病害，特别是与霜霉病之间的关系方面的报道未曾见到。在本试验中，萌动种子、子叶内的 SOD 活性是抗病品种高于感病品种，而不同叶位真叶及感染霜霉病菌后真叶内的 SOD 活性则是感病品种高于抗病品种。此问题有待进一步试验。但作者认为，酶活性与抗病性关系最密切的时期是成株期，即真叶时二者的关系更客观，故认为 SOD 活性与抗霜霉病性呈负的相关性。其可能的原因是：第一，SOD 的代谢产物中有霜霉病发育所需的物质；第二，SOD 加速叶片中抗病物质的分解，造成免疫性能下降；第三，SOD 分子结构中有一些活性基团是病原菌发育所必需的物质。

3.2 多酚氧化酶及过氧化物酶活性与其对霜霉病免疫性能的关系

多酚化合物特别是苯丙烷类化合物的一个重要生理学特性，是易于氧化，从而形成醌类化合物，然后再氧化聚合形成象黑色素一样的物质。醌化合物一般因抗菌性高而受到重视。这种氧化作用在普遍的生理学条件下由氧化酶进行。酚化合物的氧化酶分为三大类，即通常所说的多酚氧化酶、过氧化物酶和苯核氧化裂解酶。其中在植物侵染生理学方面特别引人注目的是前二种酶。一般认为氧化过程能出现高度抗病的物质^[6]。多酚氧化酶和过氧化物酶还参与木质素的合成，而木质素对于病菌是有毒的^[4]。另外，过氧化物酶与乙烯的生物合成和吲哚乙酸的氧化作用有关，这两种激素会造成整个代谢的巨大变化，并与过氧化物酶一起影响酚的代谢。本试验表明，在萌动种子、子叶、不同叶位真叶及定位真叶感染霜霉病菌后的多酚氧化酶和过氧化物酶活性均是抗病品种高于感病品种，因此认为该二种酶活性与黄瓜对霜霉病的抗性呈正的相关性。

4 初步结论

- 4.1 SOD、多酚氧化酶和过氧化物酶活性是与黄瓜对霜霉病抗性相关的因子；
- 4.2 真叶内及叶片感染霜霉病菌后叶的 SOD 活性与黄瓜对霜霉病的抗性呈负的相关性；
- 4.3 多酚氧化酶、过氧化物酶活性与黄瓜对霜霉病的抗性呈正的相关性。

参 考 文 献

- 1 王就光编．蔬菜病理学．北京：农业出版社，1979，178～179
- 2 云兴福．黄瓜组织中氨基酸、糖和叶绿素含量与其对霜霉病抗性的关系．华北农学报，1993，8（4）：52～58
- 3 云兴福．黄瓜叶片氢离子浓度和氧化还原电位与其对霜霉病抗性关系的研究．内蒙古农业科技，1993，120（2）：21～22
- 4 李靖，利容千，袁文静．黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化．植物病理学报，1991，21（4）：277～282
- 5 王爱国，罗广华，邵从本等．大豆种子超氧化物歧化酶的研究．植物生理学报，1983，9（1）：78～83
- 6 富山宏平著，尹福祥译．植物的感染生理．北京：农业出版社，1986，59～60

The Relationships Between the Activity of Several Enzymes in Cucumber Tissues and Their Resistance to Downy Mildew of Cucumber

Yun Xingfu

Cui Shimao

Huo Xiuwen

(Department of Horticulture, Inner Mongolia College of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot)

Abstract The activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) in germinated seeds, cotyledons, true leaves on different nodes and the leaves inoculated with *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov. of cucumber varieties with different resistance to downy mildew of cucumber were measured. The results showed that SOD activity in germinated seeds and cotyledons of resistant varieties were 54.15% and 35.51% higher than that of the susceptible varieties. SOD activity in true leaves on different nodes of resistant varieties was 131.51% higher than that of the susceptible varieties. Activities of polyphenol oxidase in germinated seeds, cotyledons and true leaves on different leaf nodes of resistant varieties were 62.14%, 60.00%, and 12.93% (mean of 3 leaf nodes) higher than that of the susceptible varieties respectively. Activities of prooxidase in cotyledon and true leaves on different nodes of resistant varieties were 74.47% and 28.76% higher than that of the susceptible varieties respectively. When the leaves on the second node was inoculated with *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov, the activity of polyphenol oxidase decreased with increase of the time after inoculation (i. e. increase of disease index). However, activities of two enzymes in resistant varieties were higher than those of the susceptible varieties all time, activity of SOD was going down firstly and then rising, but that of the resistant varieties was always higher than that of the susceptible varieties.

It was concluded that there was a negative correlation between the activity of SOD and resistance to downy mildew of cucumber, and there were positive correlations between the activities of polyphenol oxidase and prooxidase and the resistance to downy mildew of cucumber.

Key words: Cucumber tissue; Enzyme activity; *Pseudoperonospora cubensis*; Resistance