

马铃薯植株感染 Y 病毒后生理指标变化与抗病性的关系

夏平

(1. 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 黑龙江 克山 161606)

摘要: 本研究分别以对 PVY 感病、过敏和极端抗性的品种脱毒试管苗为材料, 比较了接种 PVY 后不同时间内超氧化物歧化酶(SOD)和游离脯氨酸含量 2 个指标的变化。从整体上看, 未接种 PVY 条件下, 感病品种(Superior)植株的 SOD 活性较极端抗性品种(IVP35)和过敏型品种(Desiree)低。接种后, IVP35 的 SOD 活性下降; Desiree 在接种前期 0.5~1 d SOD 的活性下降, 2~7 d 后 SOD 活性上升, 再后 7~14 d 又下降; Superior 接种 PVY 后, SOD 活性有上升趋势, 且在接种 2~3 d 变化率出现最大值。另外, IVP35 和 Desiree 在接种 PVY 后 SOD 变化率小, 变化范围分别为 -13.4%~ -4.6% 和 -17.8%~ -8.7%; Superior 接种 PVY 后, SOD 活性变幅较大, 范围为 5.1%~79.2%。被测的 3 个品种无论接种与否, 极端抗性品种和过敏型品种其植株内部游离脯氨酸含量均明显高于感病品种。正常情况下, IVP35 和 Desiree 的游离脯氨酸含量为 41.39~48.77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重和 33.42~39.11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重, 而 Superior 仅为 8.91~10.72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重。接种 PVY 后, Superior 的游离脯氨酸含量明显上升, 达到 11.23~21.54 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重; 虽然 IVP35 和 Desiree 的游离脯氨酸含量也呈上升趋势, 但上升幅度小, 含量分别为 48.92~72.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重和 42.46~71.34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重。

关键词: PVY; SOD; 游离脯氨酸

马铃薯 Y 病毒是马铃薯 Y 病毒组(Potviruses)的代表成员, 是引起黑龙江省马铃薯退化的主要病毒之一, 其单独侵染可使马铃薯减产 50%~80%。特别是被 PVY 侵染的马铃薯植株可以结合 PVX、PVA 等其它病毒产生复合侵染, 造成更大的损失。另外, PVY 也是马铃薯奥古巴花叶病毒、马铃薯 C 病毒、烟草蚀纹病毒的“辅助病毒”。近年来, 随着组培脱毒技术的运用和发展, PVY 得到一定程度的控制, 但是, PVY 寄主范围广, 包括易感的马铃薯植株、烟草或杂草。而这些寄主通常存在于马铃薯近缘种及栽培种的分散群体中, 并通过蚜虫频繁接种。因此, 选育抗病毒品种对控制 PVY 最有效。过去, 人们依据田间经验对抗病毒品种进行选择, 然而这种方法复杂, 育种年限长且不易交流, 有许多难以克服的弊端。为此, 诸多学者利用 PAGE 法、氨基酸测定法等对病毒侵染后植株同工酶等生理生化指标进行测定, 以期探索各指标漂移规律及其与抗病性的关系, 从而快速筛选抗病植株, 为马

铃薯抗病毒育种的早代选择提供理论依据。

本研究利用危害马铃薯生产最严重的 Y 病毒作为抗原, 分别接种具有极端抗性(E)基因、过敏性反应(H)基因和易感(S)基因的三个品种, 从接种开始, 分期对 SOD、游离脯氨酸指标进行测定, 以期通过研究确定 SOD、游离脯氨酸生理生化指标与抗病性的关系, 为马铃薯抗 Y 病毒育种提供理论依据; 通过研究不同时期的指标变化来确定各指标变化规律; 确定 PVY 抗性材料鉴定的最佳时期。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料来源于东北农业大学马铃薯研究室提供的经国外鉴定的对 PVY 有极端抗性(E)的品种 IVP35、有过敏性反应(H)的品种 Desiree、有易感基因(S)的品种 Superior 三个品种的脱毒试管苗。

1.2 试验方法

1.2.1 脱毒扩繁

2004 年 1 月 5 日进行茎尖剥离, 4 月 9 日、5 月 11 日、6 月 10 日、7 月 10 日在无菌条件下, 将

收稿日期: 2007-01-22

作者简介: 夏平(1961-), 男, 高级农艺师, 主要从事马铃薯病虫害防治及马铃薯病毒检测研究。

上述经过检测的脱毒苗按单茎节切段, 每节带一个叶片。将切段分别接种于三角瓶内的培养基上, 加入萘乙酸生根, 置于培养室内(温度 25 左右, 光照强度 2 000~3 000 lx, 16 h)培养。

1.2.2 毒源繁殖

4月9日将克山所提供黄苗榆上保存的 PVY 毒源试管苗移栽到大花盆中, 7月4日对繁殖的烟草进行电镜检测, 病毒含量很高, 7月25日接种毒源。

1.2.3 脱毒苗移栽

9月5日将各品种扩繁的脱毒苗各取出 450 株定植于两个隔离的温室中, 采用随机区组设计, 重复 3 次, 密度为 65 cm × 25 cm, 同时浇水。

1.2.4 田间接种、取样

待脱毒试管苗长出第 7 片叶时, 采用常规汁液摩擦接种法接种 PVY 病毒。接种后分别在 12 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 14 d 取样(均取上数第 4 片叶), 直到叶片显出症状为止。取下的叶片立即放于液氮中, 然后保存于 -20 备用。

1.2.5 田间植株形态学的观察

对接种的叶片进行观察, 记录植株病斑发展情况, 同时记录植株的生长势等指标, 最后, 在接种 40 d 后测定植株干物重。

1.2.6 生理生化指标的测定

马铃薯植株叶片中 SOD 酶液的提取: 取备用叶片 0.50 g 剪碎后于预冷的研钵中加入少许的石英砂, 并分别加入 3.0 mL 样品提取液(0.01 mol · L⁻¹ KCl-40%蔗糖-0.05 mol · L⁻¹ pH=7.2 磷酸缓冲液)于冰浴中快速研磨至匀浆, 然后全部转移至离心管中, 离心(10000 ×g, 4)20 min, 上清液为酶液, 于冰柜中贮存备用(-20)。

SOD 活性的测定: 采用 Stewart 和 Bewlay 的 NBT 光化还原法并加以修改, 在试管中依次加入 2.4 mL 0.5 mol · L⁻¹ pH=7.8 的磷酸缓冲液, 0.2 mL 3 × 10⁻² mol · L⁻¹ 蛋氨酸溶液, 0.2 mL 6 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 核黄素溶液, 0.1 mL 3 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ EDTA 溶液, 0.02 mL 样品 SOD 酶液, 最后加入 1.125 × 10⁻³ mol · L⁻¹ NBT 溶液 0.2 mL, 立即混匀放于黑暗中; 其中, 最大光化还原管中用 0.02 mL 的蒸馏水代替 0.02 mL 酶液, 对照管中用 0.2 mL 的蒸馏水代替 0.2 mL NBT 溶液, 同样混匀放于黑暗处。然后, 将以上各管一同放 3 000 lx 的光照下, 反应 30 min 后立即用 1 cm

比色皿在 OD=560 nm 的波长下测定吸光值。每个样品重复测定 3 次, 以抑制 NBT 的最大光化还原值 (OD_{max}) 的 50% 为一个酶活性单位(u), 样品中 SOD 活性大小的计算公式如下:

$$\text{SOD 活性}(u \cdot g^{-1} \text{FW}) = \frac{2(OD_{\text{max}} - OD_{560\text{nm}}) \times N_1}{OD_{\text{max}} \times N_2 \times W \times D \times T}$$

其中, N₁—酶提取液总体积(mL), N₂—反应体系中酶液体积(mL), W—样品鲜重(g), D—比色皿直径(cm), T—反应时间(min)。

游离脯氨酸的提取: 称取 0.5 g 马铃薯植株叶片放入研钵(或匀浆器), 加入 3 mL 80%乙醇研磨成浆状。将匀浆移入试管并用 80%乙醇洗研钵, 洗涤液也倒入大试管中, 80%乙醇匀浆液总量为 10 mL, 加盖并在沸水浴中提取 10 min。然后加入 0.25 g 活性炭粉末, 振荡后过滤并用 80%乙醇洗试管、滤渣和滤纸 3 次以上, 直至残渣中无游离脯氨酸为止。滤液搜集在烧杯中置于 80~85 水浴中蒸去乙醇, 残渣用蒸馏水洗涤并定容至 100 mL。

游离脯氨酸的测定: 取上述提取液 10 mL 加入大试管中, 再加入人造沸石 1 g, 摇动 10 min, 滤去人造沸石。取 2 mL 滤液加入试管中, 再加入 2 mL 冰醋酸和 2 mL 茚三酮试剂, 摇匀并盖上空心玻璃球, 在 100 水浴中加热 20 min, 冷却后, 用分光光度计在 515 nm 波长下测定光密度, 从标准曲线上查出脯氨酸含量。

2 结果与分析

2.1 马铃薯植株感染 PVY 后 SOD 的变化

根据试验设计, 对参试品种植株叶片的 SOD 活性进行了测定, 然后根据公式[(B-A)/A] × 100 (B—被 PVY 侵染的植株叶片中 SOD 活性, A—未接种的健株叶片中 SOD 活性), 计算各供试品种在接种与未接种条件下其 SOD 活性的变化(表 1)。

由表 1 看出, 参试的 3 个品种的植株无论是否接种 PVY, 其 SOD 活性均有较大的差异。未接种条件下, 马铃薯 Y 病毒的极端抗性品种 IVP35 和过敏型品种 Desiree 的 SOD 活性较高, 其范围分别为 349.81~425.49 μ · g⁻¹ 和 246.11~319.81 μ · g⁻¹。而感病品种(Superior)植株的 SOD 活性范围仅为 162.53~205.02 μ · g⁻¹。接种 PVY 后, IVP35 和 Desiree 的 SOD 活性范围为 325.1~416.7 μ · g⁻¹ 和 217.92~

表 1 不同抗性马铃薯品种接种 PVY 后植株叶片中 SOD 活性的变化

接种后天数 (天)	感病品种			过敏性品种			极端抗性品种		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.5	162.53	184.23	13.40	265.18	217.92	-17.80	369.44	342.91	-7.20
1	174.16	265.42	52.40	277.67	257.54	-7.30	349.81	325.10	-7.10
2	175.41	313.20	78.60	319.81	344.20	7.70	398.44	416.70	4.60
3	182.79	327.48	79.20	298.73	316.79	6.00	415.38	357.82	-13.40
5	203.91	307.90	51.00	275.62	296.30	7.50	391.24	362.24	-7.20
7	198.70	332.51	67.30	246.11	267.53	8.70	425.49	380.30	-10.60
9	205.01	301.49	47.10	269.74	252.70	-6.30	409.43	381.70	-6.80
14	183.32	315.80	72.30	303.70	273.40	-9.90	442.70	398.64	-10.00

注：A- 未接种 PVY 的马铃薯叶片 SOD 含量($\mu \cdot g^{-1}$)；B- 接种 PVY 的马铃薯叶片 SOD 含量($\mu \cdot g^{-1}$)；C- $[(B-A)/A] \times 100\%$

344.2 $\mu \cdot g^{-1}$ ，而 Superior 的 SOD 活性升高的幅度较大，范围为 184.23~327.48 $\mu \cdot g^{-1}$ 。

另外，接种后各品种植株 SOD 活性变化率上也存在差异，对 PVY 具有极端抗性的品种和过敏型品种的 SOD 含量变化率较小(范围仅为 -13.4%~

4.6%和 -17.8%~8.7%)；而对 PVY 易感的品种 Superior，其 SOD 含量的变化幅度较大，范围为 13.4%~79.2%之间。

为更清楚明确 3 个供试品种 SOD 活性的变化情况，将表 1 结果绘成图 1 和图 2。

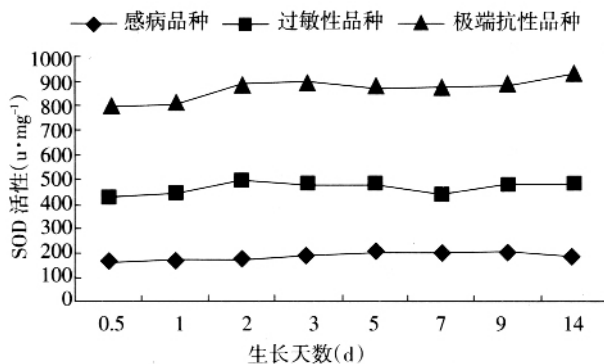


图 1 未接种 PVY 3 个品种的 SOD 活性

由图 1 和图 2 可以看出，无论接种 Y 病毒与否，供试的 3 个品种中，IVP35 的 SOD 活性均最高。另外，由图 3 看出，3 个品种在接种 Y 病毒后，其 SOD 活性变化规律不是均匀上升或均匀下降的，而是呈曲线变化，这与张丽鹃^[1]结果相符。但总体规律为极端抗性品种在接种后的 14 d 范围内，SOD 活性有下降趋势，这与陈利锋等^[2]的试验结果相似；Desiree 接种后 SOD 活性先上升，之后下降，然后又上升。而感病品种 Superior 在接种 Y 病毒后，SOD 活性均较未接种的高，且在接种后的第 3 d 出现峰值(变化率为 79.2%)。所以，接种 14 d 后 SOD 活性较低的感病品种其 SOD 值反倒与

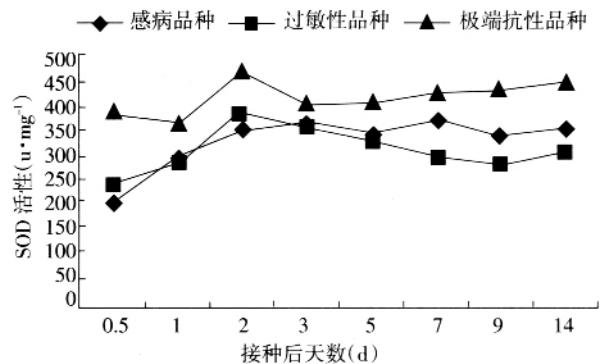


图 2 接种 PVY 后 3 个品种 SOD 活性的变化

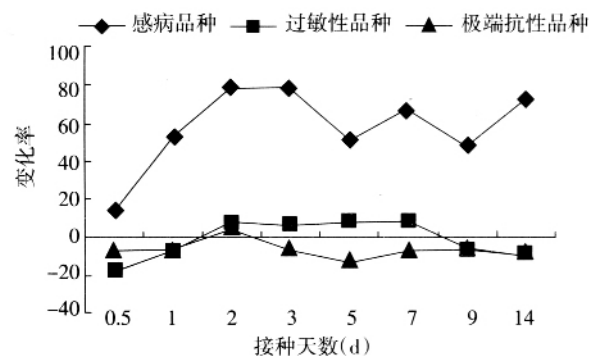


图 3 接种 PVY 后植株 SOD 活性相对变化率的比较

极端抗性品种和过敏型品种 SOD 含量相仿。由此可以说明病毒 Y 的侵染对不同寄主 SOD 活性变化

有显著影响, 值得注意的是, 接种后抗病品种SOD活性升高幅度较小, 而感病品种的 SOD 活性上升较快, 导致接种一段时间后抗、感病品种的SOD活力趋于接近, 所以, 在利用生理生化指标进行育种时, 在病毒侵染初期(0 h~7 d)进行选择尤为重要。

2.2 马铃薯植株感染 PVY 后游离脯氨酸含量的变化
现将供试 3 个品种在接种与未接种条件下游离脯氨酸含量变化结果列于表 2。同时, 将供试品种在接种与未接种条件下, 植株体内游离脯氨酸含量绘于图 4。

表 2 接种 PVY 前后供试品种植株体内游离脯氨酸含量

接种后天数 (d)	感病品种			过敏性品种			极端抗性品种		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.5	8.91	11.23	26.04	33.42	46.96	40.51	41.39	48.92	18.19
1	9.47	15.56	64.31	37.93	49.27	29.90	43.34	56.59	30.57
2	9.69	19.30	99.17	38.42	55.84	45.34	46.95	57.69	22.88
3	10.72	20.56	91.70	39.11	67.65	72.97	47.64	72.13	51.41
5	9.37	21.54	129.80	40.25	65.20	61.99	48.33	60.60	25.39
7	9.70	18.66	92.37	35.70	71.34	99.80	42.50	50.11	17.91
9	10.12	18.93	87.55	38.43	46.76	21.68	48.77	54.60	11.95
14	9.86	12.68	28.60	38.10	42.46	11.44	46.48	52.19	12.28

注: A- 未接种 PVY 的马铃薯植株体内游离脯氨酸含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); B- 接种 PVY 的马铃薯植株体内游离脯氨酸含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); C- $[(\text{B}-\text{A})/\text{A}]\times 100$ (%)

由表 2 和图 4 可以看出, 被测的 3 个品种对 PVY 具有不同抗性的马铃薯品种未受到 PVY 侵染时, 植株内部脯氨酸含量有较大的差异, 其中, IVP35 和 Desire 在未受到 PVY 侵染时游离脯氨酸含量较高, 范围分别为 $41.39\sim 48.7\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重和 $33.42\sim 39.10\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重, 而感病品种 Superior 游离脯氨酸含量仅为 $8.91\sim 10.72\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重; 当供试品种被 PVY 侵染后, 其游离脯氨酸含量均有上升的趋势, 其中, 感病品种升高的幅度较大, 变化率范围为 $26.04\%\sim 129.8\%$, 而 IVP35 和 Desiree 变化率仅为 $11.95\%\sim 51.41\%$ 和 $11.44\%\sim 99.8\%$ 。

由图 4 看出, 无论接种与否, Superior 植株游离脯氨酸含量均较其它两种类型品种植株的游离脯氨酸含量低得多, 另外, 3 个参试品种在接种 PVY 开始时 0.5~3.0 d, 游离脯氨酸含量均升高, 之后游离脯氨酸含量又下降, 这可能是由于 PVY 诱导的马铃薯植株体内游离脯氨酸含量的积累是可以逆转的。为此, 在利用游离脯氨酸含量的变化作为马铃薯 Y 病毒抗性材料的筛选指标时, 一定要在接种之后的开始阶段进行鉴定。

3 讨论

从本文研究的实验结果看出, 当马铃薯植株被 PVY 侵染后, 其内部 SOD 含量将发生一系列的变化, 但这种变化不是简单的上升或简单的下降, 而是随接种时间的延长呈曲线变化, 这与以前学者试验结果一致。另外从变化曲线已经发现对 PVY 不同抗性的 3 个品种在接种 PVY 后其内部 SOD 含量的变化规律有较大差异, 其中, 感病品种接种 PVY 后, SOD 有上升的趋势, 且在接种的 2~3 d 后出现波峰; 过敏型品种在接种 PVY 后的 0.5~1.0 d, SOD 含量下降, 之后 1~7 d SOD 上升, 再后 7~14 d SOD 含量又下降; 而极端抗性品种在接种 PVY 后植株 SOD 含量一直下降。据此我们在利用人工接

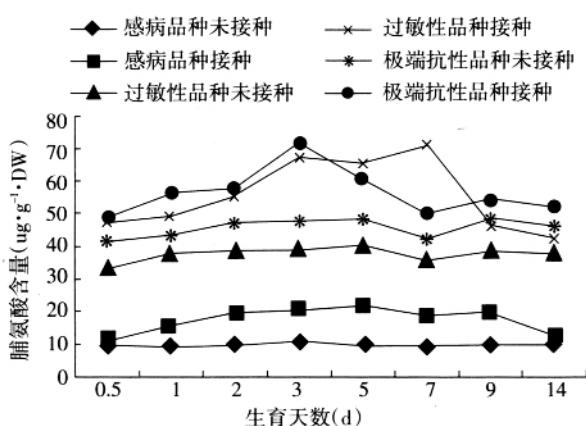


图 4 供试品种接种 PVY 前后脯氨酸含量的变化

种条件下,利用观测植株SOD变化进行PVY抗性选择中,在接种早期选择极端抗性品种和排除感病型品种是可行的,但选择过敏型品种有一定困难,因为对PVY过敏型品种接种PVY后SOD变化规律较复杂,它需要选择恰当时期,并对SOD含量的变化进行跟踪测定才能达到准确选择。

初步弄清马铃薯受到PVY侵染后3个品种游离脯氨酸含量均上升,这是由于脯氨酸氧化受抑制和合成被促进,这与Buhl等^[3]研究结果相仿,另外本研究确认3个品种未接种条件下,对PVY感病型品种其游离脯氨酸含量较其它两品种低得多。在初侵染时0.5~2.0 d,对PVY感病的马铃薯品种其游离脯氨酸急剧上升,而其它两类品种接种

后游离脯氨酸也有上升趋势,但上升幅度较感病品种的小。由此可以在初期0.5~2 d利用人工接种方法,研究植株游离脯氨酸含量的变化可以选择对PVY感病、过敏和极端抗性品种类型。

[参 考 文 献]

- [1] 张丽娟. 大豆感染灰斑病菌变化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 1998.
- [2] 陈利锋, 宋玉立. 抗病小麦品种超氧化物歧化酶和过氧化物酶的活性比较[J]. 植物病理学报, 1997, 27(3): 209-213.
- [3] Buhl M B, Stewart C R. Effect of NaCl on proline synthesis and utilization in excised barley leaves[J]. Plant Physiol, 1983, 72: 664-667.

Changes in Physiological Index and Its Relation to Resistance of Potato Plants Infected with Potato Virus Y

Xia Ping

(Potato Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China)

Abstract: Superoxide dismutase and free proline contents were compared in potato plants derived from plantlets in vitro of three potato cultivars, Superior (susceptible), IVP 35 (extremely resistant), and Desiree (hypersensitive) before and after inoculation with potato virus Y (PVY). In general, before inoculation, the superoxide dismutase content was lower in the susceptible cultivar Superior than in the resistant cultivar IVP 35 and hypersensitive cultivar Desiree. After inoculation with PVY, the superoxide dismutase content in IVP 35 decreased. For Desiree, the superoxide dismutase content decreased in the early stage of inoculation (0.5~1 days after inoculation), then increased later (2~7 days after inoculation), and finally decreased again (7~14 days after inoculation). As for Superior, the superoxide dismutase content tended to increase and had a maximal value of the rate of change 2~3 days after inoculation. In addition, the cultivars, IVP 35 and Desiree, had a small rate of change after inoculation, ranging -13.4%~4.6% and -17.8%~8.7%, respectively, while for the susceptible cultivar Superior the rate of change was large, 5.1%~79.2%. The proline contents of IVP 35 and Desiree were higher than that of Superior no matter whether the potato plants were inoculated or not. Before inoculation, the proline content of IVP 35 and Desiree were 41.39~48.77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW and 33.42~39.11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, respectively, while the proline content of Superior was only 8.91~10.72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. However, after inoculation the proline content of Superior raised obviously, and 11.23~21.54 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW were observed. The proline contents of IVP 35 and Desiree were also raised after inoculation, but only to less extent, with the values of 48.92~72.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW and 42.46~71.34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, respectively.

Key Words: *Solanum tuberosum*; potato virus Y; superoxide dismutase; proline