

马铃薯植株受病毒侵染后生化指标漂移与抗病性关系的研究进展

王 新 伟

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所 克山 161606)

摘 要: 分析了马铃薯植株受病毒侵染后过氧化物酶等防御酶、碳水化合物、可溶蛋白和游离氨基酸及核酸、激素等生化指标漂移与抗病性关系研究进展, 提出马铃薯病毒测定的新技术, 同时, 阐明了影响马铃薯生产的新问题, 提出今后马铃薯病毒汰除中生化测定的新动向。为马铃薯抗病育种提供更为可靠的理论依据。

关键词: 马铃薯; 病毒; 生化指标; 漂移; 抗病性

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 03-0161-04

1 前 言

多年来, 病毒病一直是困扰马铃薯生产的主要因素, 其中马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯卷叶病毒 (PLRV)、马铃薯 S 病毒 (PVS) 及马铃薯块茎类病毒 (PSTV) 是危害马铃薯生产的 5 种主要病毒及类病毒^[1]。而且, 某些病毒株系分化明显, 所以, 培育抗病品种至关重要。过去, 人们仅凭田间经验对抗病品种进行选择, 然而这种方面复杂, 育种年限长。为此, 诸多学者利

收稿日期: 2000-03-20

用 PAGE 法、氨基酸测定法等对被病毒侵染后植株同工酶、氨基酸等各种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, 从而达到快速筛选抗病植株, 为马铃薯抗病育种的早代选择提供理论依据。

2 国内外研究现状

2.1 过氧化物酶同工酶等防御酶与植物抗病性的关系

同工酶 (Isozyme) 是指来源相同、催化同一反应, 但分子组成和理化性质不同的酶组分类型。

[8] 谭兴杰. 荔枝果皮多酚氧化酶促褐变的研究. 植物生理学报, 1987, 13 (2): 197~203

[9] 胡小松等. 马铃薯丝加工中的褐变因素及其控制. 食品科学, 1994, 5: 35~42

[10] Sapers, G. M., Douglas, F. W. Jr., Bilyk, A., Hsu, A. F., Dower, H. W., Garzarella, L., and Kozempel, M. Enzymatic browning in Atlantic potatoes and related cultivars. J. Food Sci. 1998a, 54: 362~365

[11] Mapson and Tomalin. Preservation of peeled potatoes III. Inactivation of phenylase by heat. J. Sci. Fd. Agri. 1961, 13: 54~58

[12] Feinburg, B., Olson, r. L., and Mullins, W. r. Prepeeled potatoes. In "Potato Processing," 4th ed., 1987, 687~762. AVI-Van Nostrand Reinhold, New York.

[13] Albusu, I., King, R. D., and Kozlow, I. A. Inhibition of the catalase activity of mushroom tyrosinase by carbon monoxide. J. Agric. Food Chem. 1989, 37: 775~776

[14] 张学杰等. 马铃薯丝加工中抗褐变保鲜的筛选. 食品科学, 1999, 6: 33~35

[15] Bachem, C., Speckmann, G., Vanderlinde, P., Verheggen, F., Hunt, M., Steffens, J. and Zabeau, M. Bio/Technology. 1994, 12: 1101~1105

[16] Whitaker, J. R. Food enzyme: structure and function, pp. 1995, 284~320, Chapman & Hall

[17] MeEvily, A. J., Iyengar, R., and Gross, A. Compositions and methods for inhibiting browning in foods using resorcinol derivatives. U. S. patent. 1991a, 5: 59438

[18] Chen, J. S., Wei, C-I., and Marshall, M. R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 1991, 39: 1897~1901

[19] Sapers G. M. and Miller, R. L. Enzymatic browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphates. J. Food Sci. 1992, 57: 1132~1135

它是由 Market 和 Moller^[2]提出来的, 1966 年和 1968 年 Zwartz^[3] 与 Desborough^[4] 等人开始应用标记同工酶进行马铃薯品种鉴定。目前, 同工酶已在生理学、发育学、分类学、病理学和遗传学中得到广泛应用^[5]。

在马铃薯病理学方面的研究中, 过氧化物酶 (POD)、超氧化物酶 (SOD) 和过氧化氢酶等同工酶研究的较多, 它普遍存在于各种植物组织中, 它们是细胞内重要的氧化防御酶^[6]。

早在 1959 年, Vmaerus 发现被 PVX 侵染的马铃薯植株叶内过氧化物酶活性有增加的趋势, 后来, Chant (1967)、Novacky^[7,8] 和 Hampton (1968) 得出相同结论。但此时还没阐明同工酶的变化与抗病性的关系。后来, Wood RS (1967) 和 Kosuge (1969) 评述过氧化物酶在植物抗病中的作用, 并认为感病品种 POD 活性高于抗病品种。这时, 才有目的地研究二者的关系。Schepers 和 Reetman (1975)^[9]、Scheper 和 Beemster (1976)^[10]、Venekamp (1980)^[12]、Braber (1982) 等人对马铃薯植株感染 PVX、PVY^N 等病毒后生化指标进行了研究, 他们发现, 随植株的成熟被病毒感染的植株其内部过氧化物酶的活性升高, 同时植株自然抗性也大大增强。从此, 人们将过氧化物酶等防御酶活性的变化作为筛选抗性品种的标准。之后, Melik-seaklssov 等人于 1990 年利用过氧化物酶同工酶谱测定健株和被 PVX 侵染的植株, 结果证明, 被 PVX 侵染的植株其内部游离了过氧化物酶活性提高。

2.2 马铃薯植株碳水化合物等有机成分与抗病性关系的研究

近 20 年来, 抗病性生理生化研究的主要内容之一是寄主的代谢反应及抗病性的关系, 碳水化合物作为基础代谢物质, 与抗病性有一定的关系。Horsfall (1957) 观察某些病原菌偏向于侵染含糖量低的寄主组织, 提出“低糖病害”学说, 此后, 一些学者对其他植物感病前后糖分含量变化作了研究 (Eibote 等, 1983, 1984; 冯洁, 1991; 马奇祥, 1992; 云兴福等, 1993; 李盾, 1995)^[13~16]。

关于马铃薯病毒侵染对植株碳代谢的影响, 国内外曾有报道, Braber 等人于 1982 年将马铃薯感染 PVY 后其内部干物质含量的变化作为评价抗性标准。1984 年 Braces^[17] 和 Maag 对被 PLRV 和 PVY 两种病毒感染的 4 个品种内部淀粉和还原糖含量进行

了测定, 结果表明被 PVY 侵染的 4 个品种其淀粉产量平均下降到 72.87%; 被 PVY 侵染的品种淀粉产量仅为健株的 48.3%。并且发现, 宾捷品种还原糖含量有明显增加 (1.68%), 炸片颜色也不同程度的受两种病毒影响。1987 年, Bobes^[18] 等人研究了受感染后马铃薯植株体内的解聚酶、纤维素酶、多酚氧化酶和次葡萄糖氧化酶变化情况, 结果发现, 多酚与马铃薯抗性成正相关。1988 年, Samad^[19] 等人报道, 由 PVX 侵染马铃薯植株茎和根中碱性氧化酶活性大大地减弱, 而淄醇和木质素仅在茎中减少, 在根中过氧化物酶活性和皂苷醇略有减少。1995 年 Dermastia^[20] 利用 PVY^{NTN} 侵染马铃薯植株中发现, 易感品种 igor 受病毒感染后其根部激动素活性和无活性的 9-葡萄糖苷有转化趋势, 这种变化在复感染后观察更明显, 但这些变化在抗病品种 sabte 中却未发现。

2.3 可溶蛋白和游离氨基酸与马铃薯抗病毒性的关系

近年来, 国内外许多学者研究了植物抗病毒性和氨基酸的关系, Arumugam (1978) 在研究 bhendi 对 bhendi 黄花叶病毒性抗性机制时发现, 只有感病品种含有大量的谷氨酸、组氨酸和一些未知的氨基酸。Schuster 等 (1984)^[21] 对被 PVX 侵染的植株作内氨基酸含量进行了测定, 他们发现, PVX 侵染诱导了组氨酸和苯丙氨酸的出现。1989, Sonnewald 等人报道, 马铃薯块茎 Patatin 的出现与病虫害或机械损伤的影响有关。马厚强、蒋先明 (1992) 报道^[22], 脱毒薯植株无论是在正常或干旱的土壤条件下, 其体内游离脯氨酸含量都比带毒薯植株的低, 分别是带毒植株的 32.4% 和 55.5%。并且, 他认为带毒薯植株体内游离脯氨酸含量的提高是由于其抵抗病毒侵染、适应干旱的一种应激反应。之后, Morelli 和 Vayda (1996) 发现^[23], 被 PVX、PVY 侵染的植株在 4 小时内 32K Da 多肽增加 5~10 倍, 这是对病毒诱导的应激反应。所以, 可溶蛋白和游离氨基酸的变化可以作为筛选抗性品种的标准。

2.4 受病毒侵染后植株核酸、激素等成分的变化研究

1980 年, Venekamp^[24] 等人对马铃薯幼龄、成龄植株叶片受 PVX 侵染后其内部核糖体含量进行了分析, 结果发现, 幼龄的核糖体和 RNA 是老龄

叶片的3倍,并且,这两者含量的减少,意味着抗性的增加。同年,Shepardson等人^[25](1980)通过电镜对由PLRV侵染的植株观察,他们发现叶绿体内的淀粉和糖脂有所积累,而细胞质内核糖体含量减少。Zherbchuk(1984)研究发现被PVX侵染的马铃薯植株体内线粒体数目下降7%~14%,且线粒体内的ATP较健株下降33.5%。Babosha等人^[26](1990)利用PVX、PVY、TMV等多种病毒侵染无毒马铃薯植株叶片,层析法分析表明,类似干扰素的防御系统合成寡腺苷酸,这是侵染后才被激发的。后来,马厚强等人(1992)又发现,马铃薯无毒植株体内GA₃和IAA含量高于带毒的,而ABA含量与带毒的相近,这为解释脱毒种薯萌发早、生长迅速的规律提供了有力的依据。

3 新的马铃薯生化测定技术研究探讨

3.1 RFLP在植物病理学研究中的应用

90年代以前,病毒学所研究的病毒基因型都是根据外观形态,结合可溶性蛋白的平板电泳分析和同工酶分析(王春林,1991)^[27]。这些分析对象无疑是对基因产品,而不是基因本身。近年来,随着分子生物学的进展,限制性片段长度多态性(RFLP)分析技术被广泛应用于抗病育种中,它可以确定病毒的致病基因与植株抗病基因间的连锁关系,使人们可以通过分析RFLP标记而推知目的基因的存在。

3.2 新的免疫-PCR系统的应用

用免疫学方法检测样品中的抗原抗体,已广泛应用于植物病理学研究中(曾凡济,1997)^[28]。但受到检测系统的限制,无法检测微量或超微量抗原和抗体,更无法检测到任何生物体核酸物质。而近年发展的聚合酶连锁反应(PCR)具有敏感、特异、快速、简便等优点,被广泛应用于检测各种传染因子(如细菌、病毒等)的存在和各种基因顺序的变化。但它无法检测这些因子和基因在蛋白质水平的存在和变化。免疫-PCR是通过特异的抗体-DNA系统建立起来的一种技术,它的原理与ELISA法基本相似,所不同的是免疫-PCR用的标记物不是酶,而是一段DNA分子,并且,操作中比较ELISA法多了PCR扩增和电泳分析。由于PCR技术能将单个分子的模板扩增数百万倍,所以,免疫-PCR所测的结果要比普通ELISA法灵敏6个数量

级。

3.3 AFLP技术的应用

上述的RFLP利用探针进行Southern杂交检测基因组DNA的技术具有共显性的特点,实验结果稳定可靠。但RFLP标记仍有费时、每次检测的位点较少、要求探针的特异性较强等缺点。PCR检测技术可以提高分子标记的识别效率,它们是通过随机引物对基因组DNA进行随机扩增产生的,不需事先知道DNA序列的信息,但由于所采用的引物的T_m值较低,扩增结果容易受外界条件的影响,实验的重演性较差。而扩增酶切片段多态性(AFLP)技术结合RFLP和PCR两种技术的特点,具时具有RFLP技术的可靠性和PCR技术的高效性(尹佟明、黄敏仁,1997)^[29]。目前,已有人利用AFLP标记对作物的抗病基因进行了研究(Miria Tersa Cervera, 1996)^[30]。

4 问题及建议

a. 随着脱毒技术的发展,各种生化测定技术的改进,马铃薯脱毒效果日益完善。但目前马铃薯生产中花叶、花斑病仍然十分严重,这不能不引起人们的注意。对于这点,有些专家认为,可能由于脱毒效果的改善,使原来被掩盖的病毒和病毒弱株系有所抬头,并成为影响马铃薯生产的主要毒源。为此,重新鉴定分离我国马铃薯病毒及株系成为亟待解决的问题。

b. 目前,我国对马铃薯生长过程中生化指标的变化研究的比较多(门福义等,1994,1995,1997;刘梦芸,1994;连勇等,1996;陈芳、胡小松,1998)^[31~35]。但关于植株感染病毒后其生理生化指标的测试比较少,在马铃薯抗病育种中,生理生化指标还未完全发挥其作用。为此,进一步研究病害胁迫马铃薯生理生化的漂移与抗病性的关系是今后一段时间内必须完成的课题。

c. 通过对病毒侵染的自然抗性的分子生物学研究,包括引发体(受体)和信号传导等途径,了解各病毒的作用机理,探索病毒作用规律,为今后抗病基因工程的进一步发展奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 李汝刚等. 马铃薯X、Y病毒的单克隆抗体及其在马铃薯病毒检测上的应用. 马铃薯杂志, 1992(4): 233~236

- [2] Market C L and Fmoller. Multiple forms of enzymes; tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci*, 1959, 45; 753~763
- [3] Zwarts, J. A. Potato varieties and their protein electrophoretogram characteristic. *Eur potato J*. 1969, 9; 111~128
- [4] Desboroughs S L and S J Peloquin. Potato variety identification of electrophoresis patterns of tuber proteins and enzymes. *Am Potato J*, 1968, 45; 220~229
- [5] 纪颖彪, 屈冬玉. 同工酶在马铃薯遗传育种上的应用研究. *马铃薯杂志*, 19 (3); 169~173
- [6] 陈少裕. 膜脂过氧化与植物细胞的伤害. *植物生理学通讯*, 1991, 27 (2); 84~90
- [7] Chant, S. R., Respiration rates and peroxidase activity in virus-infected *phaseolus vulgaris*. *Experientia*, 1967, 23; 676~677
- [8] Novacky, A. R. E., Hamptom. peroxidase isoenzymes in virus-infected plants. *Phytopathology*, 1968, 58; 301~305
- [9] Schepers, A. A. J. R. Beestman. Mature plant resistance against PVY^N in relation to some morphological characteristics of the potato plant. *Abstr. conf. pap. 6th trienn. conf. EAPR*, 1975, 100~102
- [10] Schepers, A. A. B. R. Beerster. Effect of fertilizers on the susceptibility to virus infection of the potato, with special reference to mature plant resistance. *proc. 12th colloq. Int. potash Inst.* 1976, 201~210
- [11] Venekamp, J. H. A. Schepers C. B. Bus. Mature plant resistance of potato plants against virus Y^N, indicated by a decrease in concentration of ribosomes and glycoproteins in ageing potato plants under field conditions. *Neth. J. plant*. 1980, 86; 301~309
- [12] Melik-sarkison, O. S etc. Activity of peroxidase from healthy and potato X virus infected potato leaves. *Lenina* (1990) No. 5. 25~29
- [13] 冯洁. 棉株内几种生化物质与抗枯萎病之间关系的初步研究. *植物病理学报*, 1991, 21 (4); 291~296
- [14] 马奇祥. 不同抗性小麦品种感染根腐叶斑病前后生化特性的研究. *河南农业大学学报*, 1992, 26 (1); 38~43
- [15] 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. *华北农学院*, 1993, 8 (4); 52~58
- [16] 李盾. 锈菌侵染后花生体内主要生化指标的变化及其与抗性的关系. *华南农业大学学报*, 1995, 16 (1); 68~75
- [17] Breces, S.; Maaag, W. Effect of leafroll virus and virus Y on yield of starch and crisp colour. *Potato Reseach*, Interlaken, 16 July, 1984
- [18] Bobes, I.; Ragab, Z. Biochemical and physiological modifications of potato leaves and tubers infected by *erwinia carotovora* var. *atrosep-tica* and *phytophythora* infected. *Buetinul institului Agronomic*, 1987, 41; 69~84
- [19] Samad, A.; Zaidi, S. I.; Zaidi, Z. B.; Naqvi, Q. A. Effect of virus infection on alkaline oxidase, peroxidase, saponin phy-tosterol and lignin contents in brinjal plants. *Indian Journal of plant pathology*, 1988, 6 (1); 41~43
- [20] Demastia M.; Ravnkar, M. K.; Kovac, M. Increased cytokinin—9—glucosylation in roots of susceptible *solanum tuberosum* cultivar infected by potato virus YNTN
- [21] Schuster, G.; Solter, B.; Byhan. The effect of infection by potato X and treatment with the antiphytoviral substance 2, 4-dioxohexahydro—1, 3, 5-triazin on the formation and apical transport of ¹⁴C—labelled assimilates and the concentration of free amino acids. *Phy-topathologische zeitschrift*, 1984, 111 (3/4)
- [22] 马厚强, 蒋先明. 脱毒与带毒马铃薯生理特性的比较研究. *马铃薯杂志*, 1992 (4); 205~211
- [23] Morelli, J. K.; Vayda, M. E. Mechanical wounding of potato tubers induces replication of potato virus s. *Physiological and Molecular plant*, 1996, 49 (1); 33~47
- [24] Venekamp, J. H.; Beemster, A. B. R. Mature plant resistance of potato against some virus disease. I. concurrence of development of mature plant resistance against potato virus X, and decrease of ribosome and RNA content. *Netherlands Journal of plant pathology*, 1980, 86 (1); 110
- [25] Shepardson, S.; Esau, K.; Mccrum, R. Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *virology*, 1980, 105 (2); 379~392
- [26] Babosha, A. V.; Trofimits, L. N.; Ladygina, M. E. Oligoadenylates and oligoadenylate synthegens. *Doklady Botanical Science*, 1990, 313~315, 45~47
- [27] 王春林译. 马铃薯的分子生物学——发展中国家的现状及未来展望, 1991 (4); 243~246
- [28] 曾凡济. PCR 用于病毒学领域的研究现状. *病毒学杂志*, 1997 (2); 92~102
- [29] 尹佟明, 黄敏仁. AFLP 分子标记及其在植物育种上的应用. *生物工程进展*, 1997 (1); 6~11
- [30] Maria Teresa Cervera, Narijike Steenackers et al. AFLP molecular markers for resistance to *melampsora larici-populina* in poplar. *Environmental and social issues in poplar and willow cultivation and utilization*, 1996, Vol 1, 142~150
- [31] 门福义. 马铃薯高淀粉生理基础的研究——块茎淀粉含量与种薯的物质转移. *马铃薯杂志*, 1995 (4); 193~197
- [32] 门福义等. 马铃薯高淀粉生理基础的研究——品种淀粉含量与叶部氮磷钾浓度的关系. *马铃薯杂志*, 1995 (4); 193~197
- [33] 门福义等. 马铃薯不同品种淀粉积累生理基础研究——淀粉积累与磷酸化酶、蔗糖转化酶的关系. *马铃薯杂志*, 1997, (1); 1~6
- [34] 连勇等. 马铃薯试管苗茎叶过氧化物酶及根部过氧化氢酶活性分析. *马铃薯杂志*, 1996 (4); 193~196
- [35] 陈芳, 胡小松. 马铃薯块茎“低温糖化”机理的研究及进展. *马铃薯杂志*, 1998 (1); 52~55