

豚草锈菌对三裂叶豚草叶片生理生化特性的影响

曲 波^{1,2}, 王学治¹, 吕国忠², 杜 冰³, 陈旭辉¹, 杨 红²
¹沈阳农业大学生物技术学院, 辽宁 沈阳 110161; ²大连民族学院生命科学学院,
辽宁 大连 116600; ³辽宁省铁岭市植物保护站, 辽宁 铁岭 110100

摘要:【背景】自 20 世纪 50 年代三裂叶豚草传入我国以来, 迅速蔓延, 已给我国农业生产、生态环境、人民健康造成巨大威胁。近年来发现的豚草锈菌对三裂叶豚草有一定的致病性, 具备生物防治潜力。【方法】本文利用植物生理学技术研究了豚草锈菌对三裂叶豚草叶片生理生化特性的影响。【结果】锈菌侵染后, 三裂叶豚草叶片的相对电导率随病级的增高和侵染时间的延长而上升, 说明锈菌破坏了豚草叶片的细胞膜, 导致其电解质外渗。同时, 发病初期叶片内的丙二醛(MDA)与超氧自由基(O_2^-)含量逐渐上升; 当发病程度为 3 级时, O_2^- 含量达到最高; 4 级时, MDA 含量达到最高。此外, 锈菌侵染后, 三裂叶豚草叶片抗坏血酸(AsA)含量持续上升, 而脯氨酸(Pro)含量在发病后期下降, 说明在三裂叶豚草与锈菌互作时, AsA 含量虽然增加, 但抗性并不明显, 而 Pro 可能具有更为重要的作用。【结论与意义】豚草锈菌的侵入干扰了三裂叶豚草的生理生化反应, 这将为深入研究豚草锈菌的致病机理、发挥其生物防治潜力奠定基础。

关键词: 苍耳柄锈菌三裂叶豚草专化型; 三裂叶豚草; 细胞膜; 生理生化

The effects of the rust *Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae* on the leaf physiology and biochemistry of the giant ragweed (*Ambrosia trifida*)

Bo QU^{1,2}, Xue-zhi WANG¹, Guo-zhong LÜ², Bing DU³, Xu-hui CHEN¹, Hong YANG²
¹College of Biological Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China;
²College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China;
³Tieling Station for Plant Protection, Tieling, Liaoning 110100, China

Abstract: 【Background】Introduced since 1950s, giant ragweed is one of main invasive plants in China and has caused great economic losses. The giant ragweed rust (*Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifida*) is a potential new agent for biological control. A detailed study of the infection process would help to develop biological control options against this invasive species. 【Method】Physiological studies were carried out to evaluate the potential of the pathogen to be used to control giant ragweed, including electrical conductivity, the contents of malonaldehyde (MDA), superoxide radical (O_2^-), ascorbic acid (AsA), proline (Pro) in infested ragweed leaves at different stages of infection. 【Result】The electrical conductivity increased with the increasing of disease severity and length of infection time, which indicated that the rust damaged the cell membrane of leaves and caused electrolytic exosmosis. At the initial stage of the infection, the contents of MDA and O_2^- increased, the content of O_2^- was highest at disease severity grade 3, while MDA content was highest at disease severity 4. AsA content continued to increase, and Pro content decreased during the last infection stage, which indicated that resistance was not significant and Pro content probably had a more important effect in the normal functioning of leaves. 【Conclusion and significance】The leaf physiology and biochemistry was destroyed in the process of ragweed rust infection, which will provide reference for further exploring the pathogenesis and fully developing the potential of the pathogen to control ragweed.

Key words: *Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*; *Ambrosia trifida*; cell membrane; physiology and biochemistry

三裂叶豚草 *Ambrosia trifida* L. 是 20 世纪 50 年代传入我国的有害杂草(关广清, 1985)。该杂草繁殖能力强, 一旦定植, 极易形成群落, 使当地物种多样性明显下降。另外, 该杂草在夏季散发出的大量花粉是人类过敏症的重要致敏原, 因此, 该杂草也危害人类健康(万方浩等, 1993)。目前, 三裂叶豚草已遍布我国 20 多个省(市), 尤其以辽宁境内的发生和蔓延较为严重, 已给我国农业生产、生态环境、人民健康造成了巨大威胁(曲波等, 2006)。目前, 三裂叶豚草的防治方法主要以化学防治为主, 但 2007 年, 美国发现三裂叶豚草抗草甘膦种群, 使化学防治面临严峻挑战(AGROW World Crop Pro-

tection News Group, 2007)。因此,寻找更为有效的防控方法一直是豚草防治的一项重要工作。Lü *et al.* (2004a)在沈阳三裂叶豚草上发现了苍耳柄锈菌三裂叶豚草专化型(简称豚草锈菌)*Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*,通过对其生物学特性进行初步研究发现,该菌寄主专化性强,且表现出了理想的防治效果(曲波等, 2009a、2009b、2010、2011; Batra, 1981; Lü *et al.*, 2004b)。目前,有关该锈菌对三裂叶豚草致病机理的研究较少。本文通过研究豚草锈菌对三裂叶豚草叶片细胞膜与抗病物质的影响,为充分评价该锈菌对三裂叶豚草的生防效果提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 豚草锈菌采自辽宁省沈阳市东陵三裂叶豚草病叶上。

1.1.2 供试植株 将上一年成熟的三裂叶豚草种子种植于沈阳农业大学实验基地,行距 1 m,株距 1 m。待其长至 6 对叶时接种豚草锈菌。

1.2 方法

取不同发病级别的病叶,以未接种叶片为对照,测定豚草锈菌病级对三裂叶豚草各生理生化指标的影响。每个处理重复 3 次。病级的划分:0 级:全叶无病;1 级:病斑面积占叶面积的 1/5 以下;2 级:病斑面积占叶面积的 1/5 ~ 1/3 (不包括 1/3);3 级:病斑面积占叶面积的 1/3 ~ 2/3 (不包括 2/3);4 级:病斑面积占叶面积的 2/3 ~ 3/4 (不包括 3/4);5 级:病斑面积占叶面积的 3/4 以上(曲波等, 2011)。

选取发病 1 级且生育期一致、生长状态相同的叶片若干,分别于未显症,显症后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 取其叶片(曲波等, 2009)。以未发病叶片为对照,测定豚草锈菌侵染时间对三裂叶豚草各生理生化指标的影响。每个处理重复 3 次。

1.2.1 电导率的测定 采用电导法测定相对电导率(郝建军等, 2007)。将三裂叶豚草叶片洗净后用直径 1.0 cm 的打孔器打取圆片,然后用天平准确称取 0.5 g 圆片,加入 10 mL 去离子水浸泡 2 h 后测定电导率。

电导率 = 浸泡液电导率/煮沸后电导率

1.2.2 抗坏血酸(AsA)含量的测定 采用比色法测定 AsA 含量。将 1.0 g 三裂叶豚草叶片,按 1:5(W/V)加入 5% TCA 研磨, 4000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 上清液供测定。取 1.0 mL 样品提取液于试管中,依次加

入 0.5 mL 0.4% H₃PO₄-乙醇、1.0 mL 0.5% BP-乙醇、0.5 mL 0.03% FeCl₃-乙醇,总体积 5.0 mL。将溶液置于 30 °C 下反应 90 min,然后测定 $D_{534\text{ nm}}$ 。

1.2.3 脯氨酸(Pro)含量的测定 准确称取不同处理的待测植物叶片各 0.5 g,分别置于大试管中,然后向各管分别加入 5 mL 3% 磺基水杨酸溶液,在沸水浴中提取 10 min(提取过程中要经常摇动),待冷却后过滤于干净的试管中,滤液即为 Pro 的提取液。吸取 2 mL 提取液于另一个干净的带玻塞的试管中,加入 2 mL 冰醋酸及 2 mL 酸性茚三酮试剂,在沸水浴中加热 30 min,溶液即呈红色。待冷却后加入 4 mL 甲苯,摇荡 30 s,静置片刻,取上层液置于 10 mL 离心管中,在 3000 r · min⁻¹ 下离心 5 min。用吸管轻轻吸取上层 Pro 红色甲苯溶液于比色杯中,以甲苯为空白对照,测定 $D_{520\text{ nm}}$ (郝建军等, 2007)。

1.2.4 丙二醛(MDA)含量的测定 将三裂叶豚草叶片洗净后剪成小段,加适量 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸钠缓冲液(pH 7.8),慢速研磨,然后定容至 5.0 mL, 12000 r · min⁻¹ 离心 20 min,上清液即为提取液。吸取 1.5 mL 提取液于刻度试管中,加入 2.5 mL 含 0.5% 硫代巴比妥酸的 20% (W/V) 三氯乙酸溶液,于沸水浴中加热 30 min, 4000 r · min⁻¹ 离心 10 min,测定上清液的 $D_{532\text{ nm}}$ 和 $D_{600\text{ nm}}$ (赵世杰和许长成, 1994)。

MDA 含量/(nmol · g⁻¹) = [($D_{532\text{ nm}}$ - $D_{600\text{ nm}}$) × 反应液量 × 稀释倍数]/(1.55 × 10⁻¹ × 样品重/g)

1.2.5 超氧自由基(O₂⁻)含量的测定 测定方法参考徐晓晖等(2007)。取 1.0 g 三裂叶豚草叶片,放入 10 mL 试管中,并加入 5 mL 10 mmol · L⁻¹ 盐酸羟胺,真空渗入后,将试管置于 30 °C 温箱中温育 45 min。待样品温育结束后,从样品试管中吸取 2 mL 溶液,并与 1 mL 对氨基苯磺酸和 1 mL α-萘胺充分混合,约 10 min 完成显色反应。显色后的混合液如有混浊,可在 2500 r · min⁻¹ 条件下离心 10 min,去上清液,测定 $D_{530\text{ nm}}$ 后,计算 O₂⁻ 含量/(nmol · g⁻¹)。

1.3 数据分析

利用 Excel 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 豚草锈菌对三裂叶豚草叶片电导率的影响

豚草锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片相对电导率随病级的增高而上升(图 1A)。未被侵染时,叶片的相对电导率为 48%;发病 1 级时,相对电导率为 48.2%;之后随病级的上升相对电导率逐渐增大,5 级时,相对电导率达到 79%。从发病时间上看,随

锈菌侵入时间的延长,三裂叶豚草叶片的相对电导率也逐渐增大(图1B)。这表明豚草锈菌侵染使三裂叶豚草叶片细胞内容物大量流失到胞间隙,从而导致相对电导率上升。

2.2 豚草锈菌对三裂叶豚草叶片 MDA 含量的影响

锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片内的 MDA 含量随病级的增高变化较为明显(图2A)。在未侵染时,三

裂叶豚草叶片内的 MDA 含量为 $4.16 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;发病1级时,MDA 含量下降为 $1.74 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;之后随病级增高而上升,叶片发病至4级时,MDA 含量达到最高,为 $15.65 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;5级时下降为 $7.42 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从发病时间上看,随锈菌侵入时间的延长,三裂叶豚草叶片的 MDA 含量也逐渐增多(图2B)。

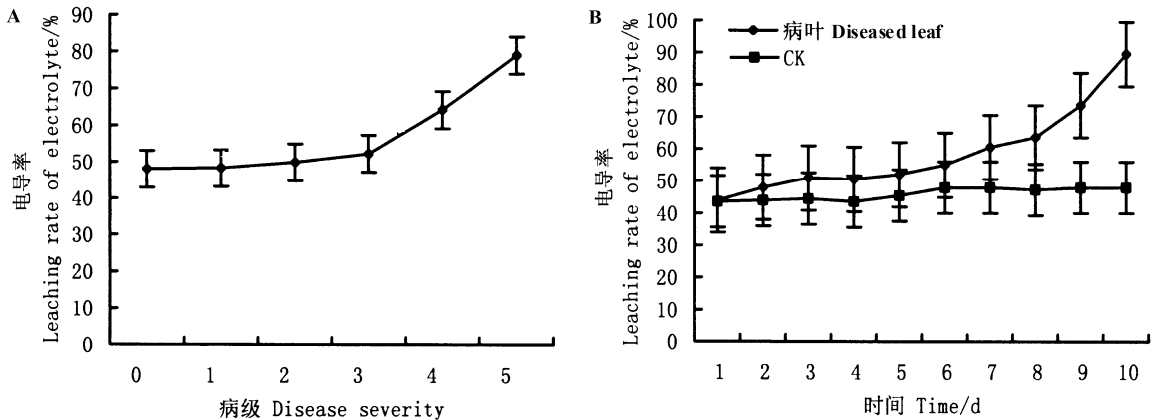


图1 锈菌病级(A)和侵染时间(B)对三裂叶豚草叶片电导率的影响

Fig.1 Effect of disease severity (A) and infection time (B) of rust on electrical conductance of giant ragweed leaves

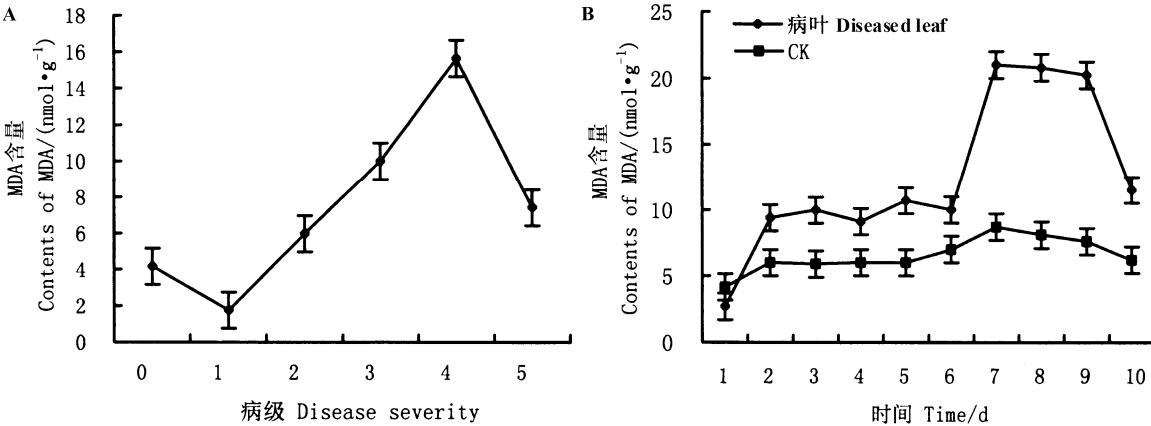


图2 锈菌病级(A)和侵染时间(B)对三裂叶豚草叶片丙二醛(MDA)含量的影响

Fig.2 Effect of disease severity (A) and infection time (B) of rust on malonaldehyde (MDA) content of giant ragweed leaves

2.3 豚草锈菌对三裂叶豚草叶片 O₂⁻ 含量的影响

锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片中的 O₂⁻ 含量保持较为平稳的上升趋势(图3A)。在未受侵染时,叶片中的 O₂⁻ 含量为 $2.55 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;当发病程度达到3级时,叶片中的 O₂⁻ 含量达到一个峰值($2.75 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$);之后有所下降;当发病程度达到5级时,叶片中的 O₂⁻ 含量最高,达到 $2.78 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从发病时间上看,随锈菌侵入时间的延长,三裂叶豚草叶片中的 O₂⁻ 含量呈逐渐增多的趋势(图3B)。

2.4 豚草锈菌对三裂叶豚草叶片 AsA 含量的影响

锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片中的 AsA 含量随

病级的增高而逐渐上升(图4A)。在未被侵染时,三裂叶豚草叶片的 AsA 含量为 $97 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;当发病1级时,叶片的 AsA 含量为 $100 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;发病5级时,叶片的 AsA 含量最高,达到 $118 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从发病时间上看,在锈菌侵入1~8 d,三裂叶豚草叶片的 AsA 含量缓慢增多;8 d 后其含量迅速上升(图4B)。

2.5 豚草锈菌对三裂叶豚草叶片 Pro 含量的影响

锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片的 Pro 含量变化不稳定(图5A)。当未被侵染时,三裂叶豚草叶片的 Pro 含量为 $341.56 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;发病1级时,叶片的 Pro 含量下降至 $293.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;之后 Pro 含量随病

级的增高而上升,发病3级时,叶片的Pro含量达到最高,为353.65 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;之后又下降。从发病时

间上看,三裂叶豚草叶片的Pro含量变化趋势与病级的影响一致(图5B)。

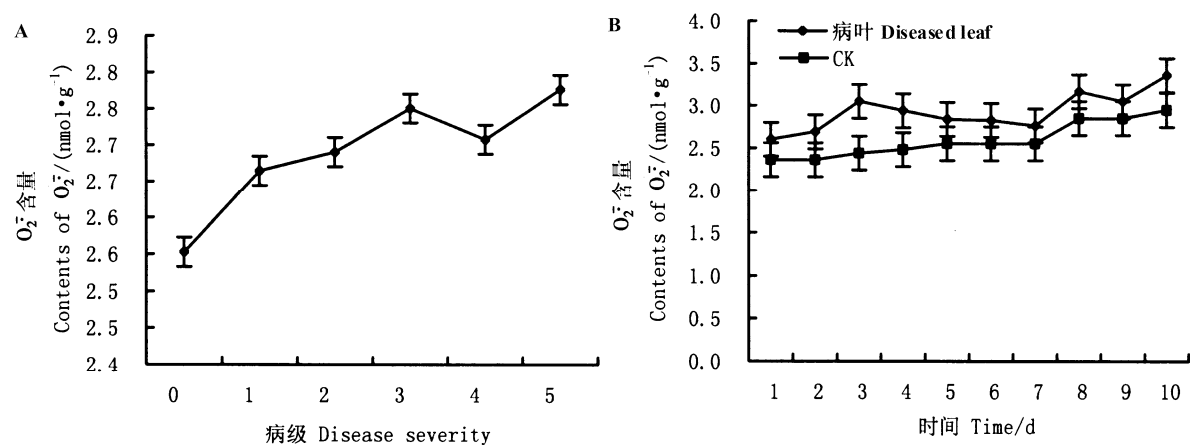


图3 锈菌病级(A)和侵染时间(B)对三裂叶豚草叶片O₂⁻含量的影响

Fig. 3 Effect of disease severity (A) and infection time (B) of rust on O₂⁻ content of giant ragweed leaves

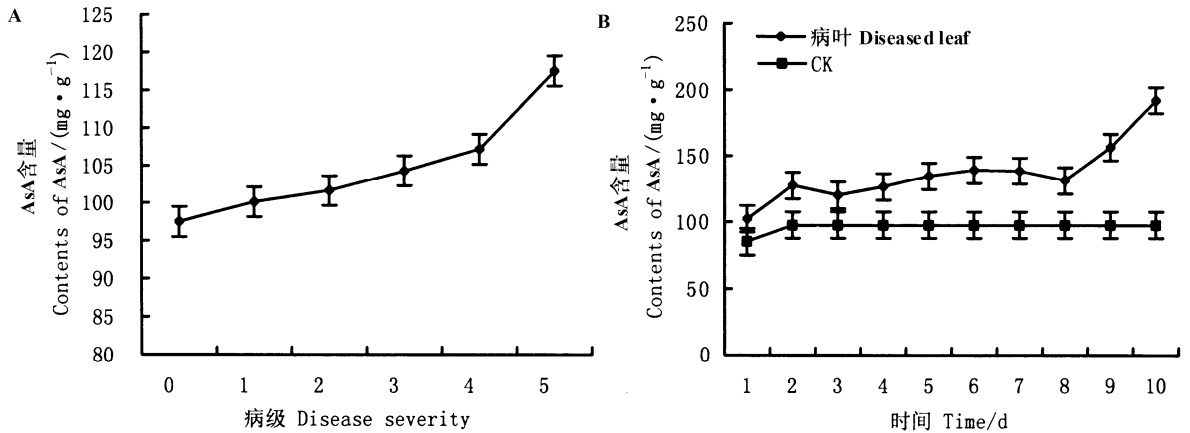


图4 锈菌病级(A)和侵染时间(B)对三裂叶豚草叶片抗坏血酸(AsA)含量的影响

Fig. 4 Effect of disease severity (A) and infection time (B) of rust on ascorbic acid (AsA) content of giant ragweed leaves

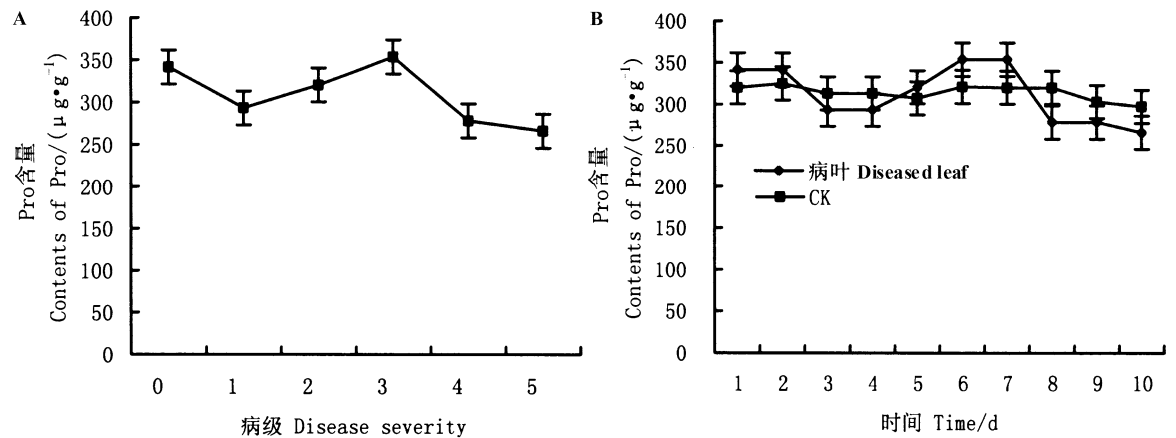


图5 锈菌病级(A)和侵染时间(B)对三裂叶豚草叶片脯氨酸(Pro)含量的影响

Fig. 5 Effect of disease severity (A) and infection time (B) of rust on proline (Pro) content of giant ragweed leaves

3 讨论

在正常情况下,生物体能够依靠体内抗氧化体系中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)消除

过量的氧自由基,从而起到保护细胞的作用。然而,在外界环境胁迫下,植物体内活性氧的产量会增多,如超氧化物阴离子自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、氢氧自由

基(-OH)、单线态氧($^1\text{O}_2$),这些自由基能参与叶绿体的降解,降低 AsA 含量及 AsA 过氧化物酶活性,攻击生物膜中的不饱和脂肪酸,引发膜脂过氧化反应,形成膜脂过氧化产物 MDA,进而破坏细胞内膜系统,导致细胞被破坏(武维华,2003)。活性氧的产生是植物抗病过程中的一个重要早期反应,是植物在病原菌侵染早期识别病原启动防卫机制的最快反应之一(陈少裕,1991)。MDA 是膜脂过氧化反应的主要产物之一,其积累是自由基毒害作用的表现,目前已成为判断膜脂过氧化作用的一个重要指标(曹锡清,1986;王建明等,2001)。当 MDA 含量过多时,植株体内的保护酶系统已无力清除自由基,细胞膜会受到严重伤害。MDA 从膜上产生的位置释放后,可以与蛋白质、核酸反应,从而丧失功能,还可使纤维素分子间的桥键松弛,或抑制蛋白质的合成(李冰等,2002)。因此,MDA 的积累可能对膜和细胞造成一定的伤害。AsA 是植物体内的抗氧化物质,能清除活性氧,降低过氧化伤害,对植物起到保护作用。Pro 作为细胞内的相容性物质,具有维持质膜结构完整性等作用(董金皋等,1999;高必达和陈捷,2006;郝丽梅等,2001)。三裂叶豚草被锈菌侵染后,其 AsA 含量持续上升,而 Pro 含量在发病后期下降,说明在三裂叶豚草与锈菌互作时,AsA 含量虽然增加,但抗性并不明显,而 Pro 可能具有更为重要的作用。

本研究结果表明,当三裂叶豚草受到锈菌侵染后,叶片的电导率呈现随病级增高和侵染时间延长而上升的趋势,说明锈菌破坏了植物细胞的细胞膜,导致其电解质外渗。锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片内的 O_2^- 含量持续上升,表明锈菌对三裂叶豚草叶片的伤害较大。MDA 含量也在叶片发病初期保持缓慢上升;当发病程度为 4 级时,MDA 含量达到最高,此时锈菌对三裂叶豚草的危害最严重;当发病程度达到 5 级时,由于植物叶片失水过多,部分叶片破碎,导致 MDA 相对含量下降。

本研究发现,锈菌侵染破坏了三裂叶豚草叶肉细胞膜的通透性,造成电解质外渗,进而影响三裂叶豚草的光合作用,抑制其正常生长。可见,豚草锈菌是防治三裂叶豚草的有效的潜在资源。我们的前期研究表明,豚草锈菌具有寄主专一性,但锈菌对寄主的识别机制还不明确,因此,有关锈菌在寄主细胞膜上具体受体识别信号的传导机制等还需进行深入研究。

参考文献

曹锡清. 1986. 脂质过氧化对细胞与机体的作用. 生物化学和生物物理进展, (2): 17-21.
陈少裕. 1991. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 27(2): 84-90.

董金皋, 樊慕贞, 韩建民. 1999. 芸苔链格孢菌毒素对白菜细胞膜透性、SOD 酶和 POD 酶活性的影响. 植物病理学报, 29(2): 138-141.
高必达, 陈捷. 2006. 植物病理生理学. 北京: 科学出版社.
关广清. 1985. 豚草和三裂叶豚草的形态特征和变异类型. 沈阳农学院学报, 16(4): 9-17.
郝建军, 康宗利, 于洋. 2007. 植物生理学研究技术. 北京: 化工出版社.
郝丽梅, 王立安, 马春红, 闫芝芬, 王建斌. 2001. 致病真菌与植物寄主相互作用关系的研究进展. 河北农业科学, 5(2): 73-78.
李冰, 刘洪涛, 孙大业, 周人纲. 2002. 植物热激反应的信号转导机理. 植物生理与分子生物学报, 28(1): 1-9.
曲波, 吕国忠, 杨红, 翟强. 2006. 辽宁省外来入侵有害生物——杂草调查. 沈阳农业大学学报, 37(4): 587-592.
曲波, 吕国忠, 杨红, 刘绍芹, 陈伟之. 2009a. 苍耳柄锈菌三裂叶豚草专化型冬孢子萌发过程及萌发条件的研究. 菌物学报, 28(3): 385-392.
曲波, 吕国忠, 杨红, 董淑萍. 2009b. 三裂叶豚草锈病发生和流行规律的研究. 菌物研究, 7(3-4): 180-184.
曲波, 黄佳丽, 张微, 杨红, 陈旭辉, 吕国忠. 2010. 三裂叶豚草锈菌寄主专化性的研究. 辽宁农业科学, (5): 50-52.
曲波, 杨红, 陈旭辉, 翟强, 董淑萍, 吕国忠. 2011. 豚草锈菌对三裂叶豚草光合生理特性的影响. 生物安全学报, 20(3): 227-231.
万方浩, 王韧, 关广清. 1993. 豚草及豚草综合治理. 北京: 中国科学出版社.
王建明, 张作刚, 郭春绒, 贺运春. 2001. 枯萎病菌对西瓜不同抗病品种丙二醛含量及某些保护酶活性的影响. 植物病理学报, 31(2): 153-156.
武维华. 2003. 植物生理学. 北京: 科学出版社.
徐晓晖, 孙骏威, 郭泽建. 2007. 植物与病原菌互作中活性氧的检测方法. 中国计量学院学报, 18(1): 49-53.
赵世杰, 许长成. 1994. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 30(3): 207-210.
AGROW World Crop Protection News Group. 2007. US glyphosate resistance warning. AGROW World Crop Protection News, 511: 10.
Batra S W T. 1981. *Puccinia xanthii* forma specialis *ambrosiae-trifidae*, a microcyclic rust for the biological control of giant ragweed, *Ambrosia trifida* (Compositae). *Mycopathologia*, 73: 61-64.
Lü G Z, Yang H, Sun X D, Yang R X and Zhao Z H. 2004a. *Puccinia xanthii* Schwein. f. sp. *ambrosiae-trifidae*, a newly recorded rust taxon on *Ambrosia* in China. 菌物学报, 23(2): 310-311.
Lü G Z, Yang H, Qu B, Huang G K, Chen W Z and Cannon P. 2004b. Ultrastructural observation of *Puccinia xanthii* Schwein. f. sp. *ambrosiae-trifidae* S. W. T. Batra. 菌物研究, 2(2): 14-16.