

文章编号: 1674-7054(2017)03-0292-09

木薯叶片组织结构及生理生化特征与其 抗细菌性枯萎病的关系

李伯凌 霍本君 朱寿松 熊茜 李可 罗丽娟 李春霞 陈银华

(海南大学 热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室,海口 570228)

摘要: 本试验选取对细菌性枯萎病具有高抗、中抗、高感的6个木薯品种,在苗期对它们叶片的组织结构进行显微观察,并对接种病原菌后叶片过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)活性和可溶性蛋白质含量变化进行测定。结果表明:不同抗性品种叶片的气孔密度和蜡质含量差异显著,与品种抗病性呈正相关;高抗品种叶片的栅栏组织细胞和海绵组织细胞排列较感病品种更整齐紧密,中抗品种和感病品种的海绵组织中则出现较多的空隙,结构比较疏松;接种病原菌后,叶片中POD和PPO的活性与木薯抗病性成正相关;可溶性蛋白质含量也有较显著的变化。

关键词: 木薯; 细菌性枯萎病; 抗病性; 叶片结构; 生理生化

中图分类号: S 533 Q 944.56 **文献标志码:** A DOI: 10.15886/j.cnki.rdswnb.2017.03.007

木薯(Cassava)属大戟科木薯属,是世界三大薯类作物之一,其块根富含淀粉,是热带地区重要的粮食作物^[1],同时也是重要的工业原料,其加工产品有变性淀粉、山梨醇、酒精、燃料乙醇等等,其加工产品被广泛应用于食品、饲料、医药、纺织、制酒等行业,其中燃料乙醇有利于缓解紧张的能源供求矛盾,因此木薯是个发展潜力巨大的能源作物^[2]。木薯细菌性枯萎病(cassava bacterial blight)是当前我国木薯生产中较严重的病害之一,木薯受其伤害后可造成大幅减产,成为木薯产业发展的严重威胁^[3]。因此研究木薯抗细菌性枯萎病的机理具有重要的意义。植物在其生长发育过程中,与病原物长期的相互作用、协同进化,形成了复杂的抗病机理。寄主植物利用多种方式来抵御病原物的侵染,按照寄主抗病机理的不同可将抗病性分为被动抗病性和主动抗病性。被动抗病性是指植物以其组织的机械坚韧性和化学物质对病原物的酶解作用来抵抗病原物的侵入和扩展。这其中包括植物表皮的蜡质层、角质层,以及气孔、水孔、皮孔的形态和叶肉的组织结构等都可以阻挡病原物的侵入^[4-5]。而主动抗病性是由病原物侵染所诱导的寄主防卫反应,其中包括一系列的生理生化反应,如过敏性坏死反应、产生植物保卫素、抗氧化相关酶的活性增强、酚类代谢加强和病程相关蛋白合成等,这些对于寄主增强对病原物的抗性具有重要的作用,尤其是防御酶类。其中,过氧化物酶(POD)是植物体内普遍存在的活性较高的一种防御性氧化酶类,能够减轻植物细胞受活性氧的伤害,在清除超氧自由基、H₂O₂和过氧化物,阻止或减少羟基自由基形成方面起到重要的作用^[6]。多酚氧化酶(PPO)参与植物体内酚类物质的氧化,其氧化产物醌类物质的积累是植物应对病原菌侵染的非专化反应,醌类物质对病原微生物具有更高的致毒性,能钝化病原物的蛋白质、酶和核酸等的合成和代谢,从而在防止病原菌侵入和抑制病原菌生长方面具有重要的作用。此外,可溶性蛋白质是组成植物细胞结构以及维持组织内渗透压稳定的重要有机物质,其含量可在一定程度上反映植物细胞的生理代谢强弱,朱健鑫^[7]发现受白粉病侵染后的高抗黄瓜品种可溶性蛋白质含量均上升,感病品种变

收稿日期: 2017-03-03

修回日期: 2017-04-11

基金项目: 国家自然科学基金(zzzz002003065)

作者简介: 李伯凌(1994-),男,安徽滁州人,海南大学热带农林学院2014级硕士研究生。

通信作者: 李春霞(1980-),女,副教授,硕士生导师, E-mail: chun_xia_li@126.com

化不明显,说明蛋白质与抗病性有一定的关系。本实验以6个不同抗性的木薯品种为对象,通过观察其叶片健株以及接种后的形态组织结构,并测定接种病原菌处理后叶片中过氧化物酶、多酚氧化酶活性和可溶性蛋白质含量的变化,探索木薯抗细菌性枯萎病的生理生化机理,为木薯抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料高抗种质 C1030、C576,中抗种质 CM3993、高感种质 C222、H077 和 C1036,来自中国热带农业科学院热带作物品种资源所国家木薯种质资源圃,移栽在海南大学农学院基地,大田常规栽培管理,生长期为2个月。其抗病性鉴定结果来自中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。

1.2 木薯抗细菌性枯萎病鉴定 将本实验室分离保存的病原菌 *XamHN04* 在 YPG 培养基平板上涂布,28℃倒置培养48 h,然后用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4$ 溶液将菌落洗下,在 OD_{600} 下调菌液浓度为0.6。选择生长良好、叶龄一致的完好复叶采用刮伤法接种,对照接等量的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4$ 溶液,接种完置于28℃的室内保湿培养,1周后观察不同品种木薯的发病情况。

1.3 病原菌接种与取样 接种方法同1.2,并于接种后0、3、6、9、12 d取样测定相关指标,每处理重复3次,其中接种0 d代表接种 MgSO_4 溶液的对照。

1.4 叶片气孔观察 于连续晴天的早晨10:00取每个品种嫩芽向下的第5片叶龄相近的健康展开叶片,沿中间主脉剪取大小约为 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的叶片浸泡于卡诺固定液($V_{\text{无水乙醇}}: V_{\text{乙酸}} = 3: 1$)中固定1 d,固定后用蒸馏水清洗干净后将下表皮置于滴有0.5% $\text{I}_2\text{-KI}$ 染液的载玻片上,染色1 min,盖上盖玻片,用吸水纸吸去多余的染液,用 Leica DM2000 型显微镜观察,在400倍镜下随机统计叶片下表皮10个视野内气孔个数并计算气孔密度,在油镜下测量气孔的开度。

1.5 叶片蜡质含量的测定 参考李海英^[8]的方法,稍作修改,称取每个品种0.3 g洗净晾干的新鲜叶片,剪碎放入20 mL氯仿中浸泡1 min,将溶液过滤到已称重的干净小烧杯中,放在通风橱中待氯仿完全挥发后再次称重,减去烧杯的重量,以单位鲜叶重表示蜡质含量,计算出叶片蜡质物的含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),每个品种重复5次。

1.6 叶片组织结构的观察 采集每个品种同一苗龄相同部位的新鲜叶片,沿叶片中间主叶脉剪成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的小块,立即置于 FAA 固定液(70%乙醇90 mL,乙酸5 mL,甲醛5 mL)中固定24 h,其中真空抽气30 min,采用常规石蜡切片法制片,经一系列脱水、透明、浸蜡、包埋等处理,Leica RM2235 石蜡切片机切片,切片厚度为 $8 \mu\text{m}$,番红固绿对染,中性树胶封片后于 Leica DM2000 型光学显微镜下观察拍照,测量叶片厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度,并计算以下指标,每个指标重复20次测量。

叶片组织结构紧密度 $\text{CTR} = \text{栅栏组织厚度} / \text{叶片厚度} \times 100\%$;

叶片组织结构疏松度 $\text{SR} = \text{海绵组织厚度} / \text{叶片厚度} \times 100\%$ 。

1.7 过氧化物酶活性测定 参照张志良^[9]的愈创木酚比色法,稍作修改,取 $100 \mu\text{L}$ 粗酶液与3 mL反应液混合立即置于分光光度计中在470 nm波长下记录吸光值,每隔30 s读数1次,共读数6次,以每分钟吸光值变化0.1为1个酶活单位,用 $\text{U} / (\text{g} \cdot \text{min}^{-1})$ 表示。

1.8 多酚氧化酶活性测定 多酚氧化酶活性测定参照文献[10]的方法。

1.9 可溶性蛋白质含量测定 参照刘萍^[11]的考马斯亮蓝 G-250 染色法,稍作修改,取木薯叶片0.1 g置于预冷的研钵中,加入2 mL预冷的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH7.8)的磷酸缓冲液,冰浴下研磨成匀浆, 4°C $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,所得上清液即蛋白提取液。

1.10 数据处理 采用 Microsoft Excel 2010 进行数据统计和作图,SPSS17.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 木薯抗细菌性枯萎病鉴定 在温室里对6个木薯品种进行了抗细菌性枯萎病鉴定,结果(图1~2)表明,各品种抗性差异明显。接种1周后,C1030和C576的叶片表型与对照无明显差异,仅在接种点出现

于对照类似的刮伤,并很快愈合,说明这 2 个品种较为抗病;CM3993 在接种点附近有少许退绿,无水渍状病斑,伤口愈合后病斑不再扩散,说明该品种具有一定抗性;而 C222、II077 和 C1036 在接种点附近出现明显退绿,有水渍状病斑,并有继续扩散的趋势,说明这 3 个品种较为感病。



图 1 不同木薯叶片对照

Fig.1 Comparison of leaves of different cassava varieties



图 2 *Xam* 侵染后不同品种木薯叶片症状

Fig.2 Leaf symptom of different cassava varieties infected by *Xam*

2.2 叶片气孔形态结构特征与抗病性的关系 木薯叶片的气孔在下表皮中的分布是不规则的,气孔周围是 2 个突起的肾型保卫细胞(图 3),但在同一时间,同一品种的气孔的开闭状态并不是呈规律性的,其中部分气孔开口较大,保卫细胞呈现较饱满的状态,而有的气孔开口较小,甚至关闭。由表 1 中可知,不同抗性品种间的气孔密度存在显著性差异,且 6 个品种叶片气孔密度的变异系数均较小,说明观测到的

表 1 不同品种木薯叶片气孔参数比较

Tab. 1 Comparison of leaf stomata parameters among different cassava varieties

品种 Variety	气孔密度		气孔长度		气孔宽度	
	Stoma density/(个·mm ⁻²)		Stoma length/μm		Stoma width/μm	
	平均值 Mean	变异系数 CV/%	平均值 Mean	变异系数 CV/%	平均值 Mean	变异系数 CV%
C1030	531.2 ± 11.1b	6.61	16.37 ± 0.75ab	14.53	2.56 ± 0.16c	19.14
C576	490.5 ± 10.9c	7.04	17.11 ± 1.00a	5.84	2.92 ± 0.90bc	10.61
CM3993	587.6 ± 17.6a	9.51	15.25 ± 0.44b	9.18	3.73 ± 0.19a	16.62
C222	459.1 ± 18.0cd	12.41	13.13 ± 0.40c	9.82	2.97 ± 0.10b	10.77
II077	418.4 ± 6.6e	4.99	13.31 ± 0.41c	11.27	3.03 ± 0.11b	11.22
C1036	443.3 ± 12.0de	8.57	13.18 ± 0.37c	8.80	2.83 ± 0.07bc	8.12

注: 小写英文字母不同表示材料在 $P=0.05$ 水平差异显著

Note: Lowercase letters represent significant difference at a 0.05 probability level

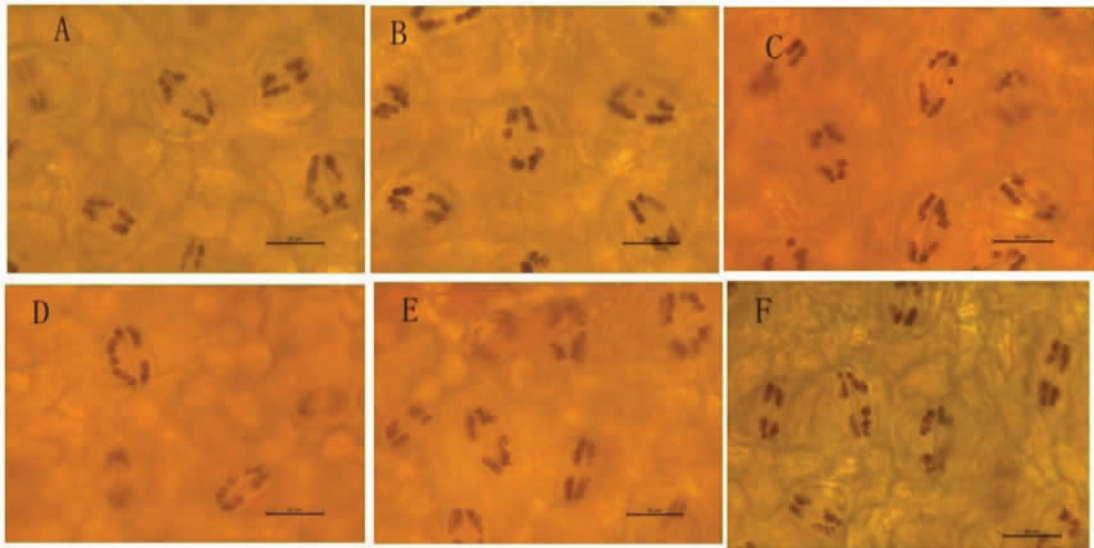


图 3 不同品种木薯叶片气孔的染色观察(10 × 100)

Fig. 3 Observation of leaf stomatal stain of different cassava varieties (10 × 100)

A: C1030 ,B: C576 ,C: CM3993 ,D: C222 ,E: C1036 ,F: II077

每个品种的气孔密度比较稳定。中抗品种 CM3993 气孔密度最大,达 587.6 个·mm⁻²,而高感品种 II077 则最低,只有 418.4 个·mm⁻²,抗性品种的气孔密度均显著大于感病品种,说明气孔密度与木薯对细菌性枯萎病抗性之间存在一定的相关性,即气孔密度越大,木薯抗病性越强。不同品种的气孔长度同样差异显著,抗性品种的气孔长度普遍高于感病品种,而不同品种的气孔宽度虽也存在差异,但由于同一时间内同一品种的气孔开闭状态并不是统一的,所以气孔宽度与抗病性关系不大。

2.3 叶片蜡质含量与抗病性的关系 不同木薯品种的蜡质含量存在明显差异,抗性品种均显著高于感病品种,中抗品种 CM3993 蜡质含量高达 8.63 mg·g⁻¹,抗性品种蜡质

表 2 不同品种木薯叶片蜡质含量的比较

Tab.2 Comparison of leaf wax contents in different varieties of cassava

品种 Variety	蜡质含量 Wax content/mg·g ⁻¹
C1030	7.95±0.35ab
C576	7.48±0.26b
CM3993	8.63±0.15a
C222	6.10±0.27c
II077	6.07±0.32c
C1036	5.74±0.27c

注:小写英文字母不同表示材料在 $P=0.05$ 水平差异显著

Note: Lowercase letters represent significant difference at a 0.05 level of probability

含量平均值为 $8.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,感病品种蜡质含量平均值为 $5.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (表 2) ,说明蜡质含量与抗病性有一定相关性 ,木薯叶片蜡质含量越高 ,其对细菌性枯萎病的抗性可能越强。

2.4 不同木薯品种叶片横切面解剖结构的比较

2.4.1 叶片组织结构的显微观察 如图 4 所示 ,6 个品种木薯叶片的基本结构是一致的 ,上下表皮均由单层细胞构成 ,均有明显的角质层 ,下表皮组织有毛状结构附着 ,栅栏组织细胞均为单层 ,海绵组织细胞排列的形状并不规则 ,且栅栏组织厚度普遍大于海绵组织厚度 ,但不同品种间的栅栏组织和海绵组织细胞排列的紧密程度有所差别。高抗品种 C1030 和 C576 的栅栏组织和海绵组织细胞的排列最整齐、紧密;中抗品种 CM3993 和高感品种 II077 的栅栏组织排列相对整齐紧密;除了 C1030 和 C576 ,其他品种的海绵组织排列相对比较疏松散乱 ,且栅栏组织和海绵组织间存在很多空隙。如图 5 所示 ,接种后 6 个品种木薯叶片的组织结构均遭到一定程度的破坏 ,其中高感品种 C222 和 II077 较为严重 ,叶片明显变薄甚至变形 ,栅栏组织内部形成空洞 ,海绵组织明显萎缩 ,叶片组织细胞遭到很大的破坏。而抗性品种的栅栏组织中有少许部位断裂 ,海绵组织变得松散 ,还能保持叶片的基本结构 ,这与接种后不同品种木薯叶片的发病表型是一致的。

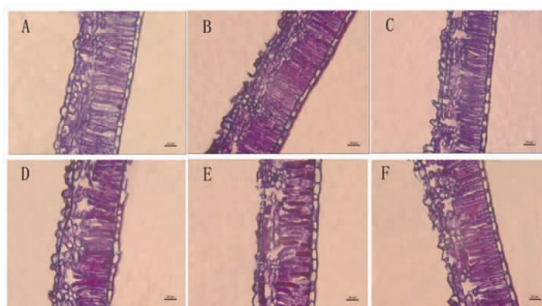


图 4 不同抗性木薯品种叶片横切面解剖结构(10×40)

Fig.4 Light micrograph of leaf cross section structure of different cassava varieties (10×40)

A: C1030, B: C576, C: CM3993, D: C222, E: C1036, F: II077

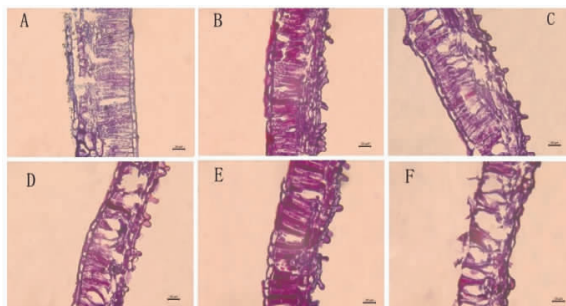


图 5 接种 9 d 后不同抗性木薯品种叶片横切面解剖结构(10×40)

Fig.5 Light micrograph of leaf cross section structure of different cassava varieties after 9 d inoculation (10×40)

A: C1030; B: C576; C: CM3993; D: C222; E: C1036; F: II077

2.4.2 叶片组织结构的比较 6 个品种的叶片厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度均存在差异(表 3) 。各品种的叶片厚度大小排列为: C1030 > C222 > C576 > C1036 > II077 > CM3993 ,可见叶片厚度与其抗病强弱间并不存在规律性。从叶片结构紧密度 CTR 来看 ,高抗品种 C1030 显著大于中抗品种和高感品种 ,抗病品种和感病品种的 CTR 平均值分别为 51.13% 和 48% ,即抗病品种的叶片组织结构较感病品种紧密 ,另外 ,高抗品种的叶片结构疏松度 SR 显著小于 3 个感病品种 ,抗病品种和感病品种的 SR 平均值分别为 25.4% 和 28.9% ,说明感病品种的叶片中海绵组织比重较大 ,叶片结构相对疏松。由此可见 ,叶片的海绵组织厚度、叶片结构疏松度 SR 可能与抗病性有一定的关系。

表 3 不同抗性木薯叶片组织结构的比较

Tab.3 Comparison of leaf tissue structure of cassava varieties with different resistance

品种 Variety	叶片厚度 Leaf thickness/ μm	栅栏组织厚度 Thickness of palisade tissue/ μm	海绵组织厚度 Thickness of spongy tissue/ μm	结构紧密度 CTR Leaf tissue compactness/%	结构疏松度 SRLeaf structure porosity/%
C1030	$114.7 \pm 2.5a$	$64.0 \pm 2.7a$	$32.1 \pm 8.1ab$	$55.8 \pm 2.8a$	$26.4 \pm 2.2b$
C576	$111.5 \pm 3.0bc$	$55.7 \pm 1.8c$	$27.0 \pm 1.8c$	$49.9 \pm 2.1bc$	$24.2 \pm 1.6c$
CM3993	$103.6 \pm 4.8e$	$49.4 \pm 2.3e$	$26.4 \pm 1.8c$	$47.7 \pm 2.2c$	$25.6 \pm 2.1bc$
C222	$113.1 \pm 2.8ab$	$57.7 \pm 2.9b$	$33.2 \pm 3.0a$	$50.9 \pm 3.9d$	$29.3 \pm 2.8a$
II077	$109.0 \pm 3.1d$	$53.5 \pm 3.1d$	$33.1 \pm 3.1a$	$44.1 \pm 6.7b$	$30.2 \pm 2.9a$
C1036	$110.1 \pm 2.6cd$	$53.9 \pm 3.3d$	$29.9 \pm 3.8b$	$49.0 \pm 3.4bc$	$27.2 \pm 3.3b$

注: 小写英文字母不同表示材料在 $P=0.05$ 水平差异显著

Note: Lowercase letters represent significant difference at a 0.05 probability level

2.5 过氧化物酶活性变化 接种 *XamHN04* 前,除 II077 外,抗病品种的 POD 活性要高于感病品种的(表 4)。接种后,各木薯品种的 POD 活性均有不同程度的升高,接种前期各个品种的 POD 活性上升较慢,3 d 后抗病品种 POD 活性急速上升,在第 6 天达到峰值后开始下降,而感病品种出现峰值较晚,接种期间抗病品种酶活性增幅明显大于感病品种,且一直高于健康植株(图 6)。

2.6 多酚氧化酶活性变化 接种前各个品种叶片中 PPO 活性差异不明显,感病品种 C1036 活性最低(表 5)。接种后叶片的 PPO 活性均呈现先上升后下降的趋势,前 3 天叶片的 PPO 活性上升较快,然后缓慢上升,至第 6 天左右达到峰值,之后开始缓慢下降,其中抗病品种的酶活性以及峰值均高于感病品种(图 7)。由此可看到叶片中 PPO 的活性与木薯抗病性呈正相关。

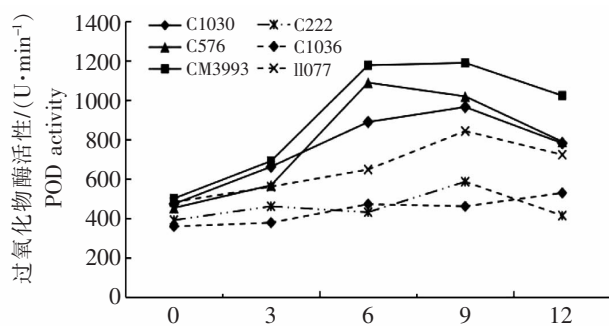


图 6 *Xam* 侵染后不同抗性木薯叶片过氧化物酶活性变化
Fig.6 The POD activities in leaves of different cassava varieties infected by *Xam*

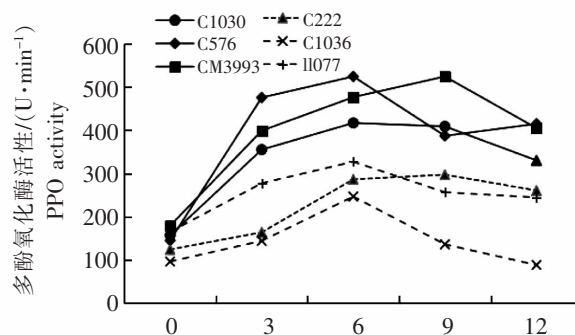


图 7 *Xam* 侵染后不同抗性木薯叶片多酚氧化酶活性变化
Fig.7 The PPO activities in leaves of different cassava varieties infected by *Xam*

表 4 接种后不同木薯品种中过氧化物酶活性的差异

Tab. 4 Differences of POD activity between different cassava varieties after inoculation

品种 Variety	接种时间 Inoculation time/d				
	0	3	6	9	12
C576	454 ± 18b	569 ± 15b	1090 ± 32a	1020 ± 24b	790 ± 24b
C1030	474 ± 11ab	663 ± 12a	890 ± 23b	966 ± 18b	782 ± 15b
CM3993	502 ± 9a	692 ± 17a	1178 ± 22a	1190 ± 34a	1024 ± 34a
C222	392 ± 7c	462 ± 10c	432 ± 18d	587 ± 16d	415 ± 15d
C1036	360 ± 14c	379 ± 10d	473 ± 16d	462 ± 24e	530 ± 20c
II077	48 ± 84ab	562 ± 23b	649 ± 23c	844 ± 25c	724 ± 22b

注: 小写英文字母不同表示材料在 $P=0.05$ 水平差异显著。

Note: Lowercase letters represent significant difference at a 0.05 probability level

表 5 接种后不同木薯品种中多酚氧化酶活性的差异

Tab.5 Differences of PPO activity between different cassava varieties after inoculation

品种 Variety	接种时间 Inoculation time/d				
	0	3	6	9	12
C576	144 ± 7.9bc	476 ± 21.8a	525 ± 17.5a	387 ± 11.5b	415 ± 24.3a
C1030	156 ± 6.7ab	355 ± 19.3b	417 ± 9.2b	409 ± 23.1b	330 ± 15.8b
CM3993	178 ± 5.8a	399 ± 22.6b	477 ± 22.5a	525 ± 15.6a	405 ± 15.1a
C222	123 ± 6.0c	163 ± 14.1d	286 ± 16.5d	297 ± 17.1c	260 ± 12.1c
C1036	95 ± 3.6d	143 ± 9.6d	246 ± 13.2d	135 ± 5.2e	87 ± 10.8d
II077	164 ± 8.4ab	277 ± 10.2c	327 ± 14.2c	256 ± 10.1d	244 ± 18.7c

注: 小写英文字母不同表示材料在 $P=0.05$ 水平差异显著。

Note: Lowercase letters represent significant difference at a 0.05 probability level

2.7 可溶性蛋白质含量变化 从接种前各个品种叶片的可溶性蛋白质含量存在明显差异,其中高抗品种 C576 含量最高,感病品种 C1036 含量最低,抗病品种的可溶性蛋白含量要高于感病品种(表 6)。接种后,C1030 和 C576 呈现先下降再上升的趋势,其他品种则是先上升再下降,但是高抗品种中叶片蛋白质含量始终高于感病品种(图 8)。

表 6 接种后不同木薯品种中可溶性蛋白质含量的差异

Tab. 6 Differences of soluble protein content between different cassava varieties after inoculation

品种 Variety	接种天数 Inoculation time/d				
	0	3	6	9	12
C576	99.41 ± 6.0a	87.76 ± 3.8a	93.34 ± 8.1a	97.3 ± 4.5a	92.87 ± 4.2a
C1030	88.34 ± 5.1a	72.31 ± 4.5b	92.6 ± 4.2a	89.2 ± 6.5a	88.72 ± 4.6a
CM3993	67.37 ± 6.9b	62.21 ± 3.7bc	82.39 ± 5.4a	88.92 ± 4.2a	78.92 ± 6.3ab
C222	51.26 ± 3.0b	58.61 ± 4.9c	78.92 ± 4.1a	63.2 ± 2.6b	53.21 ± 3.5c
C1036	23.59 ± 2.1c	44.92 ± 2.1d	48.76 ± 3.9b	38.67 ± 4.1c	42.52 ± 2.8c
II077	64.57 ± 7.9b	72.4 ± 3.7b	59.62 ± 6.7b	66.72 ± 4.9b	69.28 ± 2.4b

注:小写英文字母不同表示材料在 $P=0.05$ 水平差异显著

Note: Lowercase letters represent significant difference at a 0.05 probability level

3 讨论

植物的抗病性是多种因素综合作用的结果,研究木薯的形态结构和受病原物感染后的生理生化变化,对了解木薯和病原菌之间的互作机理和建立木薯的抗病鉴定体系具有重要的意义。植物表皮覆盖的蜡质层是植物叶片抵御病害的第 1 道防线,由于其可湿性差,不易沾附雨滴杂物等,能有效阻碍病原微生物的附着、侵入和繁殖。陈志谊^[12]等发现,水稻纹枯病的病情指数与蜡质含量呈负相关,纹枯菌在蜡质含量高的品种上侵染垫数目较少,表明蜡质含量与抗病性有密切相关性;冯丽贞^[13]等发现,桉树叶片中抗病品系蜡质含量和角质层厚度都显著大于感病品系,说明表皮的蜡质和角质是抵御病原菌入侵的重要防线。本研究结果同样表明,抗病品种的木薯叶片蜡质含量显著高于感病品种的蜡质含量,蜡质在木薯抗病中起到重要的作用(表 2)。

气孔是植物与环境进行气体和水分交换的重要生理结构,对于从气孔入侵的病原菌来说,植物表皮气孔的数量、形态结构以及开闭习性等与抗病性是密切相关的。关于气孔与植物抗病间的关系,有很多报道,如冯丽贞^[13]等发现,桉树叶片中抗病品种的上表皮气孔密度和面积均显著大于感病品种,抗病品系的叶片气孔密度显著大于感病品系,病情指数与叶正面气孔密度呈负相关即气孔密度越大越抗病。张戈壁^[14]、易龙^[15]、李敏^[16]等人的研究结果也表明,气孔密度与抗病性存在相关性。本研究结果表明:不同品种的气孔密度和长度存在显著差异,抗病品种的气孔密度和长度大于感病品种,这种特征可能更有利于植株与外界气体和水分的交换,推测可能木薯细菌性枯萎病原菌并非从气孔侵入叶片组织,而是从伤口或者水孔等感染叶片;气孔宽度与抗病性没有明显的规律(图 1 表 1)。据此可以将气孔密度和长度作为木薯抗细菌性枯萎病鉴定的参考指标。此外,通过对不同抗性木薯叶片组织做石蜡切片的显微观察,发现高抗品种的木薯叶片的栅栏组织和海绵组织细胞相对规则且排列紧凑;而中抗品种也存在少许孔隙,高感品种的叶片组织间出现大量孔隙,海绵组织较松散不规则。接种后,经过显著性方差分析,木薯的叶片厚度、栅栏

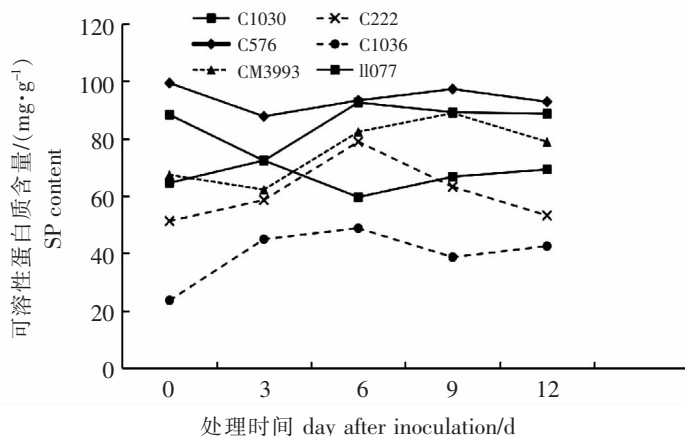


图 8 *Xam* 侵染后不同抗性木薯叶片可溶性蛋白质含量变化

Fig.8 The soluble protein content in the leaves of different cassava varieties infected by *Xam*

组织厚度与抗病性没有相关性,而不同品种的海绵组织厚度、叶片结构紧密度 CTR 和叶片结构疏松度 SR 存在显著差异,海绵组织厚度越厚、叶片结构越疏松的木薯品种越容易受到细菌性枯萎病的侵染(图2,表3),这与景岚^[17]、田丽波^[18]等的结论基本一致,因此,海绵组织厚度、CTR 和 SR 可以作为木薯抗病性鉴定的辅助指标。

病原物的侵染往往会引起寄主植物体内一些与活性氧代谢和酚类物质代谢相关的物质活性的增强,如过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)均是植物体内重要的防御性酶。前者是植物细胞内重要的活性氧清除酶,并能促进酚类前体物质的积累而形成植物木质素和保卫素等抗病物质,后者则参与酚类物质的氧化,积累的醌类物质对病原菌具有较高的毒性,能钝化病原物的蛋白质、酶和核酸等^[6],从而抑制病原菌的侵染和增殖扩展。陈年来^[19]在甜瓜上的研究表明,BTH等诱导剂处理能提高甜瓜叶片 POD、PPO 的活性,且与诱导增强的白粉病抗性成正相关。陈夕军^[5]等在研究黄瓜防御酶活性变化与抗白粉病的关系中发现,抗性品种在接种后短期内的酶活上升迅速,且持续时间相对较长,而感病品种酶活上升明显滞后且幅度较弱。在本试验中,接种后抗病品种中的两种酶活性的增幅和峰值均显著高于感病品种(图3、4),说明这2种酶的活性升高能够增强寄主对病原菌的抵抗力,可以作为木薯前期抗病鉴定的参考指标。

蛋白质是组成植物细胞结构以及维持组织内渗透压稳定的重要有机物质之一,植物体内的可溶性蛋白质包括细胞中大部分的酶类和一些病程相关蛋白(PRPs)等,但蛋白质与植株抗病性之间的关系还并不明确。张慧君^[20]研究发现接种后所有甜瓜品种的可溶性蛋白均下降,而且感病品种的下降幅度大于抗病品种。罗玉明^[21]的研究结果表明,接种大豆花叶病毒后,感斑驳品种的种皮中可溶性蛋白含量增加,抗斑驳品种的可溶性蛋白含量降低。陈桂平^[22]在研究板蓝根根腐病抗性机制时发现,未接种时的抗病品种可溶性蛋白含量高于感病品种,而在接种后,感病品种的蛋白含量开始升高。从本实验结果来看,抗病品种和感病品种在蛋白质合成代谢上存在一定差异(图5)。在病原菌侵染初期,感病植株的蛋白质含量增高,可能是由于产生了与系统获得抗性(SAR)相关联的病程相关蛋白,比如可以降解细胞壁组分的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶等水解酶类等;而侵染后期植株患病组织内蛋白质水解酶活性增高,蛋白质降解,含量又开始下降。而接种初期抗病品种蛋白质含量下降,可能是蛋白质水解合成某些抗菌物质和结构,像富含脯氨酸糖蛋白的合成,这是植物细胞壁蛋白质的重要组成部分,这有利于增强寄主的抗病性。因此,关于木薯可溶性蛋白质含量与抗病性之间的相关性还需进一步的深入研究。

本实验针对木薯叶片的组织结构特征、相关酶活性、可溶性蛋白含量进行了初步研究,结果表明这些特征与木薯抗病性有较大的关联性,可为抗性品种培育提供一定的参考。寄主与病原物之间的相互作用是个极其复杂的过程,与寄主抗病相关的组织形态结构以及生理生化指标还有很多。在下一步的研究中还可考虑增加不同抗性木薯种质的数量,接种后叶片组织的电镜观察以及其他生理指标的测定,进一步完善木薯结构特征、生理指标与抗病性的关系,为木薯的抗病育种提供科学依据。

参考文献:

- [1] 李超萍,时涛,刘先宝,等.国内木薯病害普查及细菌性萎蔫病安全性评估[J].热带作物学报,2011(1):116-121.
- [2] 詹玲.中国木薯产业发展研究[M].北京:中国农业出版社,2010:25-27.
- [3] 丘海峰.木薯细菌性枯萎病研究进展[J].现代农业科技,2011(15):164-165.
- [4] 刘进,刘建锋,曾义.寄主植物的形态结构抗病性[J].四川林业科技,2001(3):54-56.
- [5] 陈夕军,朱键鑫,陈羽,等.抗白粉病黄瓜品种的叶片组织结构及其生理生化[J].江苏农业学报,2015(1):55-61.
- [6] 谢联辉.普通植物病理学[M].北京:科学出版社,2006:302.
- [7] 朱键鑫.黄瓜不同品种对白粉病的抗性研究[D].扬州:扬州大学,2008.
- [8] 李海英,刘亚光,杨庆凯.大豆叶片结构与灰斑病抗性的研究 II.大豆叶片组织结构与灰斑病抗性的关系[J].中国油料作物学报,2002(2):59-61,67.
- [9] 张志良.植物生理学实验指导[M].3版.北京:高等教育出版社,2003:123-124.
- [10] 侯杰,严东,马万良,等.木薯叶多酚氧化酶的提取及其酶学性质研究[J].广东农业科学,2014(2):111-115.

- [11] 刘萍. 植物生理学实验[M]. 2 版. 北京: 科学出版社 2016: 80 – 83.
- [12] 陈志谊, 王玉环, 殷尚智. 水稻纹枯病抗性机制的研究[J]. 中国农业科学, 1992(4): 41 – 46.
- [13] 冯丽贞, 刘玉宝, 郭素枝, 等. 桉树叶片的解剖结构与其对焦枯病抗性的关系[J]. 电子显微学报, 2008(3): 229 – 234.
- [14] 张戈壁, 张素英. 脐橙品种溃疡病抗性与叶片生理结构的相关性[J]. 中国南方果树, 2015(2): 57 – 59.
- [15] 易龙, 夏宜林, 赖爱萍, 等. 脐橙品种‘赣南早’与‘纽荷尔’对柑橘溃疡病的抗性比较[J]. 果树学报, 2016(4): 466 – 472.
- [16] 李敏, 段硕, 李中安, 等. 叶片微形态结构特征与柑桔溃疡病抗性的关系[J]. 中国南方果树, 2013(2): 1 – 5.
- [17] 景岚, 王丽芳, 康俊, 等. 向日葵品种叶片组织结构与抗锈病的关系[J]. 植物保护, 2009(2): 81 – 84.
- [18] 田丽波, 商桑, 杨衍, 等. 苦瓜叶片结构与白粉病抗性的关系[J]. 西北植物学报, 2013(10): 2010 – 2015.
- [19] 陈年来, 乃小英, 张玉鑫, 等. 植物源诱导剂对甜瓜叶片防卫酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2010(10): 2016 – 2021.
- [20] 张慧君, 张建农. 甜瓜抗白粉病的生理机制[J]. 江苏农业学报, 2009(5): 1129 – 1131.
- [21] 罗玉明, 张晓燕, 华春. 大麦黄花叶病抗性机理的初步研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2000(4): 93 – 96.
- [22] 陈桂平, 项慧新, 张文. 板蓝根中根腐病与可溶性蛋白关系的研究[J]. 唐山学院学报, 2007(4): 112 – 114.

The Structure and Physiological Characteristics of Cassava Leaves and Their Relationship with the Resistance to Bacterial Blight

LI Boling, HUO Benjun, ZHU Shousong, XIONG Qian, LI Ke, LUO Lijuan, LI Chunxia, CHEN Yinhua
(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources / Agriculture College of Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Seedlings of six cassava cultivars with high resistance, medium resistance or high susceptibility to bacterial blight were selected to observe their leaf anatomical structure characteristics by using microscope. The seedlings were then inoculated with a strain (*XamHN04*) of the pathogen of cassava bacterial blight [*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*)] to determine the change of peroxidase (POD) and polyphenol-oxidase (PPO) activities and soluble protein content in the leaves. The results showed that the stoma density and wax content in the leaves were significantly higher in the resistant cassava varieties than in the susceptible ones, indicating that they were positively correlated with the resistance of cassava varieties. The palisade and spongy tissues of the resistant varieties were more compact and tight than those of the susceptible ones. In addition, the spongy tissues of medium resistant and highly susceptible varieties were relatively loose in structure with lots of spaces. The activities of POD and PPO in the leaves inoculated with the pathogen strain *XamHN04* were determined to be positively correlated with the resistance to the bacterial blight, and the content of soluble protein had significant change in the leaves after inoculation. These results implied that the leaf anatomical structure and physiological characteristics could be the markers for cassava resistance to bacterial blight.

Keywords: Cassava; bacterial blight; resistance; leaf structure; physio-chemical