

DOI:CNKI:61-1390/S.20120109.1219.004

网络出版时间:2012-01-09 12:19

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120109.1219.004.html

大蒜抗叶枯病变异系的离体筛选及其抗性分析

程智慧,牛 青,孟焕文

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】利用病菌粗毒素离体筛选大蒜抗叶枯病变异系,建立抗病变异系离体筛选方法。【方法】以蒜瓣茎盘为外植体诱导愈伤组织;以大蒜叶枯病菌培养滤液制取的粗毒素为筛选剂,离体筛选大蒜抗叶枯病变异系;通过接种病菌粗毒素和病菌孢子鉴定变异株的抗病性,分析变异株的防御酶活性。【结果】大蒜叶枯病菌粗毒素对大蒜愈伤组织增殖有显著抑制作用,抑制作用随病菌粗毒素质量分数的增加而增强,不同大蒜品种愈伤组织对病菌粗毒素的抗性不同;利用不同体积分数的病菌粗毒素分步筛选分别获得大蒜品种 G039 变异系苗 12 株,G073 变异系苗 2 株,它们对大蒜叶枯病菌粗毒素具有稳定的抗性。经病菌孢子悬浮液接种鉴定,变异系苗较其对照抗病性提高。大蒜抗叶枯病变异系苗接种病菌后叶片过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性在短时间内即达到峰值,且与抗病品种 G064 接近或更高,而感病品种 G039 的酶活性则明显低于前两者。【结论】利用不同体积分数的大蒜叶枯病菌粗毒素分步筛选可以获得大蒜抗叶枯病变异系,适宜大蒜抗叶枯病变异系分步筛选的上限粗毒素体积分数为 30%;POD、PPO 和 PAL 活性可作为大蒜抗叶枯病鉴定的生化指标。

【关键词】 大蒜;叶枯病;病菌粗毒素;抗病变异系;离体筛选与鉴定

【中图分类号】 S633.403.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)02-0109-07

In vitro selection of garlic mutants resistant to leaf blight and analysis of their resistance

CHENG Zhi-hui, NIU Qing, MENG Huan-wen

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to select garlic resistant mutants and to set *in vitro* selection method by adding the pathogen crude toxin in culture medium. 【Method】 The resistant mutants were selected using callus derived from clove base explants and the filtrate (crude toxin) of garlic leaf blight pathogen culture solution as the selective agent, and identified by inoculation of crude toxin and pathogen spores to the mutants, respectively. The activities of some defense enzymes in mutant garlic plantlets were measured to analyze the relation between garlic leaf blight resistance and those enzymes. 【Result】 The crude toxin of pathogen inhibited the induction and multiplication of garlic callus. The inhibition increased with the increase of crude toxin concentration. The callus of different garlic cultivars showed different resistance to the pathogen crude toxin. Using step by step screen method to increase the concentration of pathogen crude toxin, 12 mutant plantlets from garlic cv G039 and 2 plantlets from garlic cv G073 were selected. These mutants were proven to attain stable resistance to pathogen crude toxin. The mutants were also proven to gain improved resistance to leaf blight than their control by pathogen spore inoculation test. The activities of POD, PPO and PAL in leaves of the mutant increased sharply and reached the peak values

* [收稿日期] 2011-08-26

[基金项目] 国家公益性行业(农业)科研专项(200903018-7)

[作者简介] 程智慧(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事蔬菜生理生态和生物技术研究。

[通信作者] 孟焕文(1961—),女,陕西蒲城人,副教授,主要从事蔬菜生理生态和黄瓜育种研究。E-mail: menghw2005@163.com

in short time after inoculation of pathogen, which were close to or even higher than those of the resistant cv G064. However, the activities of those enzymes in disease sensitive cv G039 were much lower than those of the mutant and the resistant cv G064. Disease resistance identification by inoculation of pathogen spore solution showed that the mutant lines were more resistant to the disease than their controls. The change of POD, PPO and PAL activities in screened mutants after inoculation of the pathogen spores reflected their disease resistance. 【Conclusion】 It is practicable to select garlic mutants resistant to leaf blight by increasing the concentration of pathogen crude toxin in the selective culture medium step by step. The proper maximum concentration of crude toxin for *in vitro* selection is 30%. The enzyme activities of POD, PPO and PAL can be taken as biochemical indexes for garlic resistant identification to leaf blight.

Key words: garlic; leaf blight; pathogen culture crude toxin; disease resistant mutant; selection *in vitro* and identification

叶枯病是大蒜生产中的主要真菌性病害之一,在国内外均有不同程度的发生,主要为害叶片、叶鞘及薹茎等部位,以叶片发病为主,危害严重时叶片大量枯死,造成严重的经济损失,严重制约着大蒜生产的发展。化学防治是目前生产上防治大蒜叶枯病的主要和最有效的方法,但药剂残留会污染环境,影响人类健康,存在严重弊端^[1]。应用抗病品种是病害防治的根本途径,但大蒜花粉败育,一般都不能正常结籽,生产中常采用鳞茎进行无性繁殖^[2],而无性繁殖系数低,还加速品种老化和退化。因此,寻求有效的育种途径已成为近年来大蒜育种工作的重点。

植物组织培养过程中易发生变异,已被作为遗传变异的重要来源^[3]。在组织培养过程中,培养基中添加诱变因子可以定向高效诱导植物变异,这已成为植物细胞工程创造和筛选变异的重要途径。前人利用这一途径已在马铃薯^[3]、大蒜^[4]等作物上筛选出耐盐等抗逆变异系,在马铃薯^[5]、大麦^[6]、水稻^[7]、辣椒^[8]、胡椒^[9]、枸杞^[10]等作物上筛选出抗病变异系。但利用病菌培养产生的粗毒素离体筛选大蒜抗叶枯病变异系,国内外都尚未见报道。

病原菌侵染后寄主植物一些酶活性的变化与其抗病性有密切关系。过氧化物酶(POD)能抵御活性氧及氧自由基对细胞膜系统的伤害,苯丙氨酸解氨酶(PAL)和多酚氧化酶(PPO)可以促进植物体产生多种次生代谢物质,阻止病原菌的侵入和繁殖^[11-13]。这些抗病性相关的酶活性在一些植物上可作为抗病性鉴定的生化指标。

本试验以蒜瓣茎盘为外植体诱导大蒜愈伤组织,以大蒜叶枯病菌培养滤液(粗毒素)为筛选剂,在愈伤组织增殖培养基中添加病菌粗毒素,采用分步筛选法离体筛选抗性愈伤组织并再生抗病变异系,分析变异系对病菌粗毒素抗性的稳定性和对病原菌

的抗性,探讨变异株的防御酶活性及其与抗病性的关系,以期为大蒜抗叶枯病变异系离体筛选和育种,以及抗病变异系的生化鉴定提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大蒜材料和培养基 大蒜材料为本课题组大蒜种质资源圃种植保存的叶枯病感病品种 G039、G073 和抗病品种 G064 的鳞茎。愈伤组织诱导和增殖培养基:MS+30 mg/kg 蔗糖+7 mg/kg 琼脂+2 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA,pH 5.8;愈伤组织分化培养基:MS+30 mg/kg 蔗糖+7 mg/kg 琼脂+2 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA,pH 5.8;生根培养基:MS+30 mg/kg 蔗糖+7 mg/kg 琼脂^[4]。

1.1.2 病原菌和培养基 大蒜叶枯病菌株由本课题组前期从陕西杨凌大蒜生产田叶枯病病株上分离,经病菌形态学和致病性鉴定后于实验室保存^[1]。菌株繁殖采用 PDA 固体培养基;病菌粗毒素培养采用 Czapek-Dox 液体培养基,其组成为 NaNO₃ 3.0 g/L,K₂HPO₄ 1.0 g/L,MgSO₄ 0.50 g/L,KCl 0.50 g/L,FeSO₄ 10 mg/L,蔗糖 30 g/L,pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 大蒜愈伤组织的获得 选取 3 个大蒜品种健康无病的鳞茎,剥瓣去皮,先用自来水冲洗,再用洗洁精洗去表面污垢,然后在超净工作台上用体积分数 75%酒精消毒 30 s、体积分数 10%次氯酸钠溶液消毒 20 min,无菌水漂洗 3 次,每次 5 min,切取蒜瓣基部高 0.5 cm 的茎盘部位,纵切成 4 块,接种到愈伤组织诱导培养基上,置于光照 2 000 lx(16 h/d)、温度(25±1)℃条件下诱导培养 30 d 获得大蒜愈伤组织。

1.2.2 大蒜叶枯病菌株孢子悬浮液的制备 取供

试大蒜叶枯病菌株,接种在 PDA 固体培养基上,于 20 ℃ 黑暗培养至菌丝长满培养皿,打取直径 5 mm 的菌饼置于另一培养皿中,加无菌水 20 mL,放入 4 ℃ 冰箱黑暗条件下释放孢子,用血球计数板测算孢子浓度,加无菌水调整孢子浓度为 10^7 mL^{-1} 。

1.2.3 大蒜叶枯病菌粗毒素的制备 在 250 mL 三角瓶中加入 Czapek-Dox 液体培养基 100 mL,接种 1.2.2 繁殖的菌饼 4 块,置 24 ℃ 黑暗条件下振荡(转速 100~120 r/min)培养 20 d,用 8 层灭菌滤纸过滤菌液,滤去菌丝体,滤液经 4 000 r/min 离心 15 min,上清液用 0.45 μm 滤器过滤获得病原菌粗毒素原液^[5]。

1.2.4 大蒜叶枯病抗性变异系的分步筛选 选取 1.2.1 获得的大蒜品种 G039 和 G073 的愈伤组织,接种在大蒜叶枯病菌粗毒素体积分数为 20% 的愈伤组织增殖培养基中,每瓶 4 块,每处理 40 个愈伤组织。培养条件同 1.2.1,培养 20 d 后,将未褐化且生长明显的愈伤组织转接至粗毒素体积分数为 30% 的愈伤组织增殖培养基继代筛选培养,20 d 后,再将生长明显的愈伤组织转至粗毒素体积分数为 40% 的愈伤组织增殖培养基上继代培养 20 d。每次继代培养前后用精度 0.001 的电子天平称量愈伤组织鲜质量,计算愈伤组织增殖率^[14]。愈伤组织增殖率=(培养后愈伤组织鲜质量-接种愈伤组织鲜质量)/接种愈伤组织鲜质量 $\times 100\%$ 。

1.2.5 大蒜叶枯病抗性细胞系稳定性分析 将在大蒜叶枯病菌粗毒素体积分数为 30% 的愈伤组织增殖培养基上生长良好的愈伤组织,转接至不含粗毒素的愈伤组织增殖培养基上继代增殖 2 次,再转接至粗毒素体积分数为 30% 的愈伤组织增殖培养基上培养,以未经粗毒素筛选的愈伤组织为对照,统计各处理存活的愈伤组织数,根据接种愈伤组织数和存活愈伤组织数计算愈伤组织存活率,根据接种的愈伤组织鲜质量变化计算愈伤组织增殖率,分析抗性稳定性,淘汰对病菌粗毒素适应的细胞系。

1.2.6 大蒜叶枯病抗性愈伤组织芽的诱导 将 1.2.4 中最高体积分数大蒜叶枯病菌粗毒素筛选的、在增殖培养基上可生长的抗性愈伤组织转接至分化培养基上,以未经粗毒素筛选的愈伤组织为对照,进行芽的分化培养。

1.2.7 大蒜叶枯病变异系苗的抗性鉴定 将 1.2.6 抗性愈伤组织分化的不定芽分割,转入粗毒素体积分数为 30% 的生根培养基上培养 15 d 后统计生根

情况,根据生根能力初步鉴定其抗性。将生根的抗性苗及其对照苗移入装有栽培基质的营养钵中,炼苗成活后,待第 4 片真叶展开时用小刀在每株同叶位的叶片上割出伤口,每株 1 个伤口,滴上浓度 10^7 mL^{-1} 的大蒜叶枯病菌孢子悬浮液 1 滴。然后置于 24 ℃、相对湿度 80% 的光照培养箱中培养,以未经粗毒素筛选的 2 个感病品种及抗病品种 G064 为对照,观察比较发病情况。

1.2.8 大蒜抗感材料抗病相关酶活性分析 取 1.2.7 获得的 G039 变异系苗,以未经粗毒素筛选的感病品种 G039 和抗病品种 G064 为对照,按 1.2.7 的方法接种病菌。分别在接菌前和接菌后 12, 24, 48, 72, 108 h 剪取功能叶样,液氮速冻,用于抗病相关酶活性分析。PPO 活性采用邻苯二酚法测定, PAL 活性采用 L-苯丙氨酸法测定^[13], POD 活性采用愈创木酚法测定。以每克鲜质量每分钟 OD 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位,每个样品重复测定 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 大蒜叶枯病菌粗毒素对大蒜愈伤组织增殖的影响

将大蒜愈伤组织接种在含不同体积分数大蒜叶枯病菌粗毒素的愈伤组织增殖培养基上,培养结果见表 1。由表 1 可以看出,用大蒜叶枯病菌粗毒素筛选培养大蒜愈伤组织时,随病菌粗毒素体积分数的增加,大蒜愈伤组织的增殖率呈下降趋势,且出现了死亡现象。当大蒜叶枯病菌粗毒素体积分数为 20% 时,各大蒜品种愈伤组织增殖率均下降 50% 左右,生长量明显减小,愈伤组织由原来的淡黄紧实变得发白松散;当粗毒素体积分数达到 40% 时,仅有极个别愈伤组织生存下来,且愈伤组织生长慢,质地松散发白(图 1)。

2.2 大蒜叶枯病抗性细胞系的稳定性

由表 2 可以看出,同在大蒜叶枯病菌粗毒素体积分数为 30% 的培养基上培养,筛选的大蒜抗性变异系与其对照的愈伤组织增殖率和存活率均有明显差异。G039 和 G073 品种的抗性变异系愈伤组织增殖率分别为 38.4% 和 35.9%,存活率分别为 80.2% 和 83.0%,而对照则受到很强抑制,存活率只有 5.3% 和 7.8%,增殖率仅 7.1% 和 5.3%。这表明,筛选获得的抗性变异系对大蒜抗叶枯病菌粗毒素具有稳定的抗性。

表 1 大蒜叶枯病菌粗毒素对大蒜愈伤组织增殖的影响

Table 1 Effect of pathogen crude toxin on garlic callus growth and propagation

粗毒素体积分数/% Crude toxin concentrations	大蒜品种 Garlic cultivar	接种愈伤组织数 No. of callus inoculated	存活愈伤组织数 No. of survival callus	愈伤组织增殖率/% Rate of callus growth	愈伤组织生长状态 Growth state of callus
0	G039	40	40	97.9	+++++
	G073	40	40	98.6	+++++
20	G039	40	23	55.2	+++
	G073	40	24	54.6	+++
30	G039	20	9	23.5	++
	G073	20	11	23.3	++
40	G039	15	4	11.8	++
	G073	15	5	12.1	++

注：“+++++”代表愈伤组织生长最好;“+++”代表愈伤组织生长中等,有褐化;“++”代表愈伤组织生长不良,褐化严重。

Note:“+++++” means that the callus had the best growth;“+++” means that the callus had common growth,sometimes browning;“++” means that the callus had poor growth,browning seriously.



图 1 大蒜叶枯病菌粗毒素对大蒜愈伤组织生长的影响

1. 对照愈伤组织;2. 在体积分数 20%粗毒素培养基上的愈伤组织;3. 在体积分数 40%粗毒素培养基上的愈伤组织

Fig. 1 Impact of pathogen crude toxin on growth of garlic callus

1. Callus of the control;2. Callus on the medium containing 20% crude toxin;
3. Callus on the medium containing 40% crude toxin

表 2 大蒜叶枯病抗性细胞系的稳定性

Table 2 Analysis of screened cell mutant line resistibility to pathogen crude toxin of garlic leaf blight %

大蒜品种 Variety of garlic	愈伤组织存活率 Rate of survival callus		愈伤组织增殖率 Growth rate of callus	
	变异系 Variation	对照 CK	变异系 Variation	对照 CK
G039	80.2	5.3	38.4	7.1
G073	83.0	7.8	35.9	5.3

2.3 大蒜叶枯病抗性细胞系的分化特性

芽分化培养结果表明,在不含大蒜叶枯病菌粗毒素的芽分化培养基上,抗性愈伤组织和对照愈伤组织都能同时分化出芽,但与对照相比,同时期内抗性愈伤组织分化芽数较少,而分化根数较多(图 2)。

抗性芽生根培养结果显示,在大蒜叶枯病菌粗毒素体积分数 30%的生根培养基上,抗性芽可以生根,而对照芽不能生根且逐渐枯黄(图 3)。G039 大蒜品种的抗性芽苗有 15 株生根,4 株生根处褐化,2 株干枯;G073 大蒜品种的抗性芽苗有 2 株生根,3 株生根处褐化,4 株干枯;而 2 个品种的对照芽苗在含病菌粗毒素的培养基上干枯明显,且无生根现象。

2.4 大蒜抗叶枯病变异系的抗性鉴定

将在体积分数 30%大蒜叶枯病菌粗毒素培养基上生根的抗性苗经炼苗后移出三角瓶,移栽在苗钵中,获得成活的 G039 大蒜品种变异系苗 12 株,G073 大蒜品种变异系苗 2 株。经接种大蒜叶枯病菌孢子悬浮液后培养 7 d,变异系苗只在叶片上接种孢子悬浮液的位置略微枯黄,而对照苗在叶片上接种孢子悬浮液的位置已长出明显的黑色霉层,且在同株未接种孢子悬浮液的叶片上也出现小白斑。变异系苗中以 G039 发病稍重,接菌叶片枯黄明显;G073 变异系苗发病稍轻。抗病品种 G064 苗发病最轻,只在接种孢子悬浮液的叶片出现零星小白斑。试验分别获得 G039 和 G073 2 个大蒜品种的抗叶枯病变异苗(图 4)。

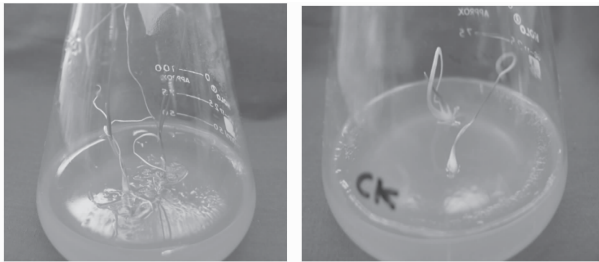
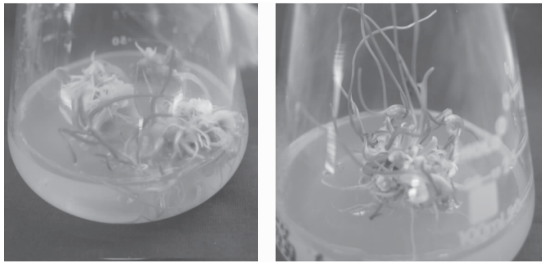


图 2 G039 大蒜品种抗性愈伤组织(左)和对照(右)的芽分化情况
Fig. 2 Differentiation of the resistant callus(left)and its control(right)of garlic cv G039

图 3 G039 大蒜品种抗性芽(左)和对照(右)在体积分数 30%大蒜叶枯病菌粗毒素培养基上的生根情况
Fig. 3 Rooting of the resistant bud(left) and its control (right) of cv G039 on medium containing 30% crude toxin

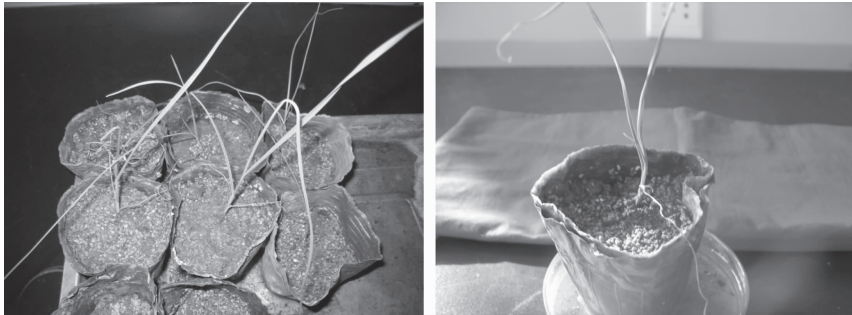


图 4 筛选的 G039(左)和 G073(右)大蒜叶枯病抗性变异苗
Fig. 4 Screened resistant plantlets of garlic cv G039(left)and cv G073(right)

2.5 大蒜叶枯病抗性变异系接种病菌后相关酶活性的变化

2.5.1 POD 活性 由图 5 可以看出,大蒜抗叶枯病变异系与其对照(G039)在接种病菌 24 h 内 POD 活性变化总体趋势相近,即接种病菌后 POD 活性上升,12 h 后达到高峰,但各时期变异系 POD 活性均明显大于对照。抗病品种 G064 的 POD 活性变化呈双峰型,在处理 48 h 达到另一个峰值,两峰值接近。

2.5.2 PPO 活性 由图 6 可以看出,接菌前,大蒜叶枯病抗性变异系与抗病和感病品种的 PPO 水平一致,且均在接菌后 12 h 达到各自的最高峰值。变异系 PPO 水平在 48 h 达到另一个峰值,之后呈直线下降趋势;感病品种 G039 的 PPO 活性则在达到第一峰值后开始下降,一直没有再回升;抗病品种 G064 的 PPO 水平下降缓慢,期间有回升,在病症出现的 108 h,其活性与变异系持平。

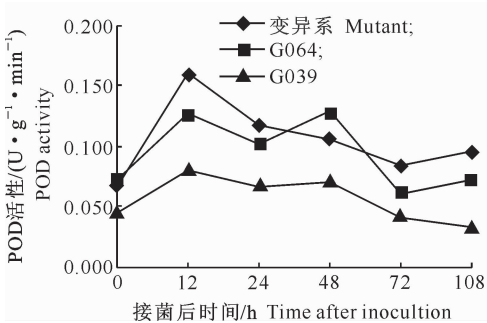


图 5 接种叶枯病菌后大蒜抗病苗与抗病和感病品种 POD 活性的变化
Fig. 5 Changes of POD activity in screened disease resistant garlic lines and disease resistant and sensitive cultivars

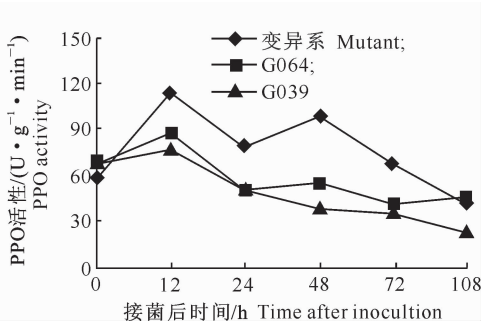


图 6 接种叶枯病菌后大蒜抗病苗与抗病和感病品种 PPO 活性的变化
Fig. 6 Changes of PPO activity in screened disease resistant garlic lines and disease resistant and sensitive cultivars

2.5.3 PAL 活性 由图 7 可以看出,大蒜叶枯病

抗性变异系和抗病品种 G064 的 PAL 活性均在接

菌后 24 h 迅速达到高峰,前者峰值高于后者,之后都开始下降;感病品种 G039 的 PAL 活性变化迟缓并持续上升,接菌 48 h 达到峰值。接菌后 108 h 出现病症时,PAL 活性仍以变异系最高。

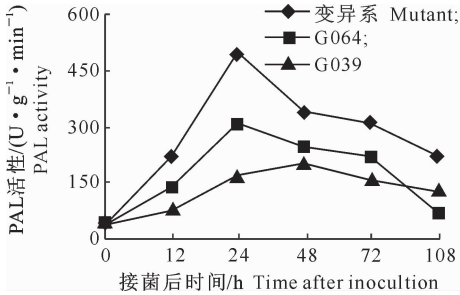


图 7 接种叶枯病菌后大蒜抗病苗与抗病和感病品种 PAL 活性的变化
Fig. 7 Changes of PAL activity in screened disease resistant garlic lines and disease resistant and sensitive cultivars

3 讨论

病原菌粗毒素是病原菌产生的毒性代谢产物^[15],在寄主植物病害的发生、发展过程中起明显的致病作用^[16-17],对植物的组织、器官和离体培养细胞都有明显的毒害作用^[5,8]。植物抗病性一般与抗毒素能力有密切关系,基于这种关系,人们在组织培养条件下利用病菌粗毒素已经筛选出了许多植物的抗病变异系^[5-6,9-10]。马龙彪等^[18]报道,甜菜褐斑病培养滤液对愈伤组织的诱导率和再生苗率均有一定的抑制作用。本研究将大蒜愈伤组织接种于含大蒜叶枯病菌粗毒素的筛选培养基上诱导抗病变异,发现大蒜叶枯病菌粗毒素对大蒜愈伤组织增殖有明显的抑制作用,抑制作用随病菌粗毒素体积分数的增加而增强,说明植物病原菌粗毒素对植物离体培养细胞的毒害抑制作用具有一定的普遍性^[9]。

利用病菌毒素筛选抗病变异系时,毒素剂量和选择次数是关键问题。剂量高易导致一些抗病材料的丢失;剂量低,选择压力太小,则不易选出高抗材料。但目前尚无确定毒素适宜剂量和选择次数的统一标准。曹有龙等^[10]在含毒素体积分数 60%的条件下筛选获得抗根腐病毒毒素的枸杞愈伤组织,并再生植株。刘进平等^[9]用粗毒素体积分数 50%作为选择剂压力上限,筛选出了抗瘟病胡椒再生植株。本试验结果显示,体积分数 20%粗毒素培养筛选不出大蒜叶枯病抗性变异系;体积分数 40%粗毒素培养获得的抗性愈伤组织数量太少,不适合抗性筛选;在体积分数 30%粗毒素条件下抗性愈伤组织可以生长并成功获得抗病变异系,是大蒜抗叶枯病变异

系分步筛选粗毒素的适宜上限浓度。不同病原菌产生毒素的能力不同,同一病菌培养时间或培养条件不同产生的毒素量也不同。本研究是在前期试验对大蒜叶枯病菌粗毒素培养条件筛选确定的最佳培养条件下制备菌株粗毒素的,所以在较低的筛选浓度压力下即可筛选出大蒜抗叶枯病变异系。

抗性愈伤组织的抗性稳定性鉴定非常必要。这一方面是由于在一定的选择压力下,会存在一部分生理适应的细胞而非真正的变异细胞;另一方面,也可能存在一些嵌合体细胞系,而这些细胞系可能并未对毒素真正产生抗性。本研究将筛选的抗大蒜叶枯病细胞变异系在无毒素培养基上继代 2 次后,再次转接至粗毒素体积分数 30%的筛选培养基培养,发现抗性愈伤组织仍有一定的生长量,而对照则完全受抑制。这表明,经不同体积分数粗毒素分步筛选的大蒜抗性细胞变异系对大蒜叶枯病菌粗毒素具有稳定的抗性。

酶在植物抗病过程中具有重要作用。氧化酶类(如 POD、PPO 等)能将酚类物质转化成木质素、植保素等,从而提高植物抗病性。POD 参与木质素的聚合,而细胞壁的高度木质化对病菌的侵染和扩展有一定的抑制作用,常被认为与植物抗病性有关^[19]。本研究中抗性变异系大蒜苗在接种病菌后,其 POD 活性上升,这可能有利于木质素的合成,加强细胞的木质化,从而增强大蒜植株抵抗锈菌的侵染和扩展能力^[20]。PPO 是植物体内酚类物质氧化或缩合以及木质素合成的重要酶,可催化酚类物质氧化形成咖啡酸、绿原酸等多种具有抗病作用的物质,同时催化形成的预苯酸又是合成木质素的前体,可以修复伤口^[12-13]。PPO 还可将根皮甘肽基氧化变成毒素更强的化合物,可杀死病原菌^[21-22]。PAL 是苯丙烷代谢途径中的第一个关键酶,可被光、病原物、激素等多种因素诱导,与植物体内的植保素和木质素等抗性物质的合成密切相关^[21]。本研究结果表明,大蒜抗叶枯病变异系苗接种病菌后 POD、PPO 和 PAL 活性均在短时间即达到峰值,这些酶活性与抗病品种 G064 接近或更高,而感病品种 G039 的酶活性则明显低于抗病品种 G064 和抗病变异系。因此,这 3 种酶活性指标可作为大蒜抗叶枯病鉴定的生化指标。

[参考文献]

[1] 张志强,程智慧,沈永杰. 大蒜叶枯病菌毒素产生条件的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(12):186-

- 190.
- Zhang Z Q, Cheng Z H, Shen Y J. Conditions of toxin production of *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons in garlic [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(12): 186-190. (in Chinese)
- [2] 张昌伟, 侯喜林, 袁建玉, 等. 太仓大蒜根尖离体培养直接诱导不定芽及其试管鳞茎的形成 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 167-170.
- Zhang C W, Hou X L, Yuan J Y, et al. Direct induction of the adventitious bud from the root tips of Taicang garlic and formation of its bulblet *in vitro* [J]. Plant Physiology Communications, 2004, 40(2): 167-170. (in Chinese)
- [3] 程智慧, 李 娟, 张国裕. 利用马铃薯茎段离体筛选耐盐变异体 [J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 635-638.
- Cheng Z H, Li J, Zhang G Y. *In vitro* selection of salt-tolerant mutant from potato stem explants [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(3): 635-638. (in Chinese)
- [4] 张恩让, 程智慧, 周新民. 大蒜体细胞无性系的染色体变异研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(9): 73-76.
- Zhang E R, Cheng Z H, Zhou X M. Study on chromosomal variation of somatic clones of garlic [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2004, 32(9): 73-76. (in Chinese)
- [5] 程智慧, 邢宇俊. 利用马铃薯晚疫病菌粗毒素离体筛选马铃薯抗晚疫病无性系 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2402-2407.
- Cheng Z H, Xing Y J. *In vitro* screening of resistant potato clones to late blight with crude *Phytophthora infestans* toxin [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(12): 2402-2407. (in Chinese)
- [6] Chand R, Sen D, Prasad K D, et al. Screening for disease resistance in barley cultivars against *Bipolaris sorokiniana* using callus culture method [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2008, 46(4): 249-253.
- [7] 敖世恩, 杨 媚, 周而勋, 等. 离体筛选的水稻抗纹枯病突变体的生理生化特性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(2): 39-41.
- Ao S E, Yang M, Zhou E X, et al. Physiological and biochemical characterization of *in vitro*-screened rice somatic mutants resistant to sheath blight [J]. Journal of South China Agricultural University, 2006, 27(2): 39-41. (in Chinese)
- [8] 李大伟, 黄 伟, 巩振辉. 辣椒抗枯萎病体细胞变异无性系筛选粗毒素适宜剂量的研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(6): 130-134.
- Li D W, Huang W, Gong Z H. Study on the proper concentration of crude toxin for somaclonal variation resistant to capsicum wilt [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 15(6): 130-134. (in Chinese)
- [9] 刘进平, 郑成木. 利用辣椒疫霉培养滤液体外筛选胡椒抗瘟病无性系研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 528-532.
- Liu J P, Zheng C M. *In vitro* selection of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) somaclones resistant to foot rot using culture filtrate of *Phytophthora capsici* [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2004, 12(6): 528-532. (in Chinese)
- [10] 曹有龙, 贾勇炯, 赵 军, 等. 应用组织培养技术离体筛选枸杞抗根腐病变异体的研究 [J]. 植物病理学报, 1999, 29(2): 163-168.
- Cao Y L, Jia Y J, Zhao J, et al. *In vitro* screening of resistant variants of *Lycium barbarum* L. to root rot disease [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1999, 29(2): 163-168. (in Chinese)
- [11] 崔彦玲, 张 环. 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相关性 [J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 79-82.
- Cui Y L, Zhang H. Correlation analyses between resistance to *Cladosporium fulvum* and PAL activity in tomato [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2003, 18(1): 79-82. (in Chinese)
- [12] 齐绍武, 官春云, 刘春林. 甘蓝型油菜品系一些酶的活性与抗细菌核病的关系 [J]. 作物学报, 2004, 30(3): 270-273.
- Qi S W, Guan C Y, Liu C L. Relationship between some enzyme activity and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of rapeseed cultivars [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(3): 270-273. (in Chinese)
- [13] 邹芳斌, 司龙亨, 李 新, 等. 黄瓜枯萎病抗性与防御系统几种酶活性关系的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 181-184.
- Zou F B, Si L T, Li X, et al. The relation between the resistance of the cucumber wilt and the activities of several enzyme in defense system [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(3): 181-184. (in Chinese)
- [14] 张素芝, 李纪蓉. 植物激素对大蒜茎盘组织培养的影响 [J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(5): 805-808.
- Zhang S Z, Li J R. Effects of phytohormones on callus induction shoot differentiation and genetic variation in the tissue culture of stem discs of garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2006, 28(5): 805-808. (in Chinese)
- [15] Lardner R, Mlahoney N, Zanker T P, et al. Secondary metabolite production by the fungal pathogen *Eutypa lata*: Analysis of extracts from grapevine cultures and detection of those metabolites in planta [J]. Australian Journal of Grape and Wine Erwearch, 2006, 12(2): 107-114.
- [16] 张欣芳, 苏前富, 宋淑云, 等. 玉米弯孢病菌毒素的研究进展 [J]. 玉米科学, 2009, 17(6): 118-120, 123.
- Zhang X F, Su Q F, Song S Y, et al. Advances of research on the toxin from *Curvularia lunata* [J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(6): 118-120, 123. (in Chinese)
- [17] 陈夕军, 徐 艳, 童蕴慧, 等. 水稻纹枯病菌毒素致病机理研究 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(4): 439-443.
- Chen X J, Xu Y, Tong Y H, et al. Pathogenic mechanism of phytotoxin produced by *Rhizoctonia solani*, the causal pathogen of rice sheath blight [J]. Acta Phytopathology Sinica, 2009, 39(4): 439-443. (in Chinese)
- [18] 马龙彪, 张悦琴, 吴则东. 抗甜菜褐斑病体细胞无性系变异的研究 [J]. 中国糖料, 2001(1): 1-5.
- Ma L B, Zhang Y Q, Wu Z D. Study on somaclonal variation of sugarbeet leafspot resistance [J]. Sugar Crops of China, 2001(1): 1-5. (in Chinese)