

LSV 和 LMoV 侵染对百合光合生理和抗氧化酶活性的影响

徐品三*, 姜旭, 贾娟

(大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要:以东方百合“西伯利亚”为试验材料,研究了百合无症病毒(LSV)和百合斑驳病毒(LMoV)侵染对植株光合生理和抗氧化酶活性的影响.检测结果表明:LSV侵染叶片中叶绿素a、b以及总叶绿素含量与健康叶片相比分别降低了15.8%、16.6%和11.1%;LMoV侵染叶片分别降低了24.3%、22.6%和16.5%.LSV侵染叶片中净光合速率、胞间CO₂浓度和气孔导度与健康叶片相比分别降低了19.2%、13.4%和15.1%;LMoV侵染叶片分别降低了50.6%、48.2%和29.6%.LSV侵染叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性与健康对照组相比分别增加了24.6%、29.4%、16.5%和23.4%;LMoV侵染叶片分别增加了10.6%、18.2%、9.6%和19.6%.可见,百合植株光合生理和抗氧化酶活性均受到LSV和LMoV侵染的影响,危害程度,LMoV高于LSV.

关键词:百合无症病毒;百合斑驳病毒;光合生理;抗氧化酶活性;叶绿素

中图分类号:S682.12;Q785 **文献标识码:**A **doi:**10.7511/dllgxb201404006

0 引言

百合无症病毒(lily symptomless virus, LSV)隶属于香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*),主要危害百合科植物.受该病毒侵染的百合一般外部症状不明显,但种球退化严重^[1].百合斑驳病毒(lily mottle virus, LMoV)又名郁金香碎色病毒百合株系(tulip breaking virus lily strain, TBV),属于马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*),寄主主要是百合属和郁金香属植物^[2],该病毒分布范围较广,在国内外均有发现^[3-5].LSV和LMoV复合感染百合较为常见,病症明显,表现为叶片出现斑驳、分叉扭曲,花变形,蕾不开放,植株矮小等症状^[6],是目前严重影响百合生长发育的主要病毒.近年随着我国百合栽培面积逐年增大,该病毒在我国的发生日趋严重,目前还没有有效的方法加以防治.

对于LSV和LMoV的研究目前主要还是集中在病毒检测和组培脱毒等方面,近年通过分子生物学技术对这两种病毒基因做了初步的分析^[7-8],但有关这两种病毒的致病性生理生化机理

还不清楚.一般病毒侵入植物体后,主要是破坏叶绿体结构,影响植株的光合作用,导致植株出现各种病症^[9].研究发现,被LSV侵染的百合外部症状没有LMoV的明显,那么被侵染的百合的生理生化指标变化是否也有差异?本研究通过检测感染LSV和LMoV百合叶片的光合生理和抗氧化酶活性,了解这两种病毒危害百合的致病特性,为深入研究这两种病毒的致病机理提供参考.

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为东方百合“西伯利亚”,盆栽的百合放于防虫网隔离的温室中.当鳞茎长出6对叶片时,采用常规汁液摩擦接种法分别接种LSV和LMoV^[10],健康植株以磷酸缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.2)接种叶片作为对照.从接种第6 d到第30 d进行叶绿素含量和光合生理指标检测,从第3 d到第21 d测定各种抗氧化酶活性.同时通过PCR对生长期的接种百合和健康百合进行LSV

鉴定,以确定感病与健康对照的准确性.

1.2 叶绿素含量的测定

参照 Balachandran 等^[11]的方法,采用打孔器获取百合叶片,以丙酮浸润提取叶绿素,用 DU-7 型紫外分光光度计分别测定 OD_{663} 和 OD_{645} . 再根据 Arnon 公式^[12] 计算出以下 4 组数据:叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量,以及叶绿素 a 与叶绿素 b 含量的比值. 每个处理和对照各设 3 次重复.

1.3 气孔导度、光合速率和胞间 CO₂ 浓度的测定

采用 CIRAS-1 型便携式光合测定仪分别测定植物叶片的净光合速率 (P_n)、胞间 CO₂ 浓度 (C_i) 和气孔导度 (G_s). 检测对象为从顶部数第 4 对叶片,光量子通量为 $1\,000\,\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 装置内反应供应的 CO₂ 浓度为 $1\,000\,\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,测定环境温度控制在 25℃,相对湿度为 65%. 每个处理和对照各重复 3 次.

1.4 酶活性测定

取待测的百合叶片(去除叶脉)0.1 g 于冰预冷的研钵中,用液氮进行研磨,加 2 mL 冰预冷的提取介质,冰浴研磨成浆液,将匀浆倒入离心管中,于 4℃、10 000 r/min 条件下,离心 15 min,分离的上清液为粗酶液. 得到粗酶液后,测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性.

2 结果与分析

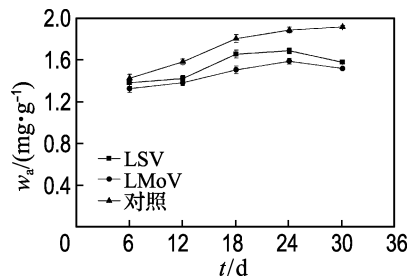
2.1 LSV 及 LMoV 侵染对百合叶绿素含量的影响

在 LSV 及 LMoV 侵染百合叶片组织后,其叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量,以及叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的比值均表现出先增长后下降的趋势,且均低于健康对照组,尤其在接种后期下降幅度较大,差异性显著(图 1). LMoV 侵染后,叶绿素含量等各个指标较 LSV 侵染株降幅大. 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量与健康对照组相比,LSV 侵染株平均分别降低了 15.8%、16.6% 和 11.1%;LMoV 侵染株平均分别降低了 24.3%、22.6% 和 16.5%.

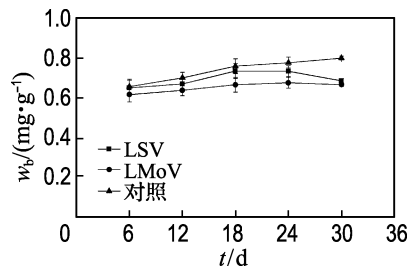
2.2 LSV 及 LMoV 侵染对百合植株光合生理的影响

LSV 和 LMoV 接种百合叶片后,净光合速率

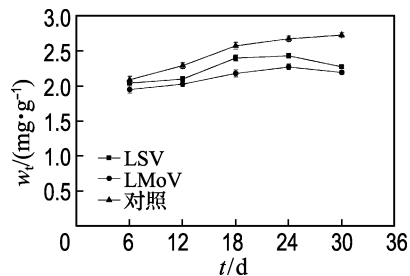
(P_n)、胞间 CO₂ 浓度(C_i)和气孔导度(G_s)均低于健康对照组. 从接种到接种后 24 d,与健康对照组一致均呈上升趋势,但之后开始下降,与健康对照



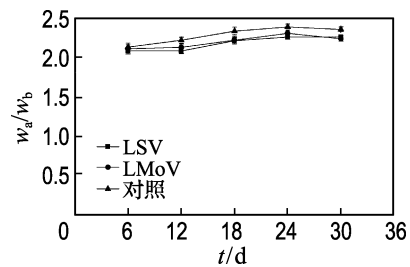
(a) 叶绿素 a



(b) 叶绿素 b



(c) 总叶绿素



(d) 叶绿素 a 与叶绿素 b 含量比值

图 1 LSV 和 LMoV 侵染百合“西伯利亚”6~30 d 的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量,以及叶绿素 a 与叶绿素 b 含量比值

Fig. 1 Chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll contents and the ratio of chlorophyll a and b content of *L. × 'Siberian'* infected 6-30 d by LSV and LMoV

组相比 LSV 侵染株分别降低了 19.2%、13.4% 和 15.1%; LMoV 侵染株分别降低了 50.6%、48.2% 和 29.6%. LMoV 侵染百合的 P_n 、 C_i 和 G_s 明显低于 LSV, 尤其 P_n 和 C_i 更加显著(图 2).

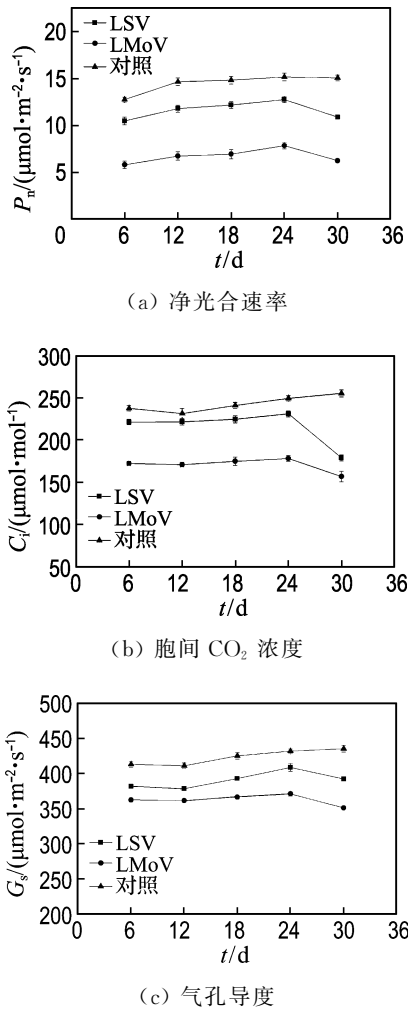


图 2 LSV 和 LMoV 侵染百合“西伯利亚” 6~30 d 的净光合速率、胞间 CO₂ 浓度 和气孔导度

Fig. 2 P_n , C_i and G_s of *L. x 'Siberian'* infected 6-30 d by LSV and LMoV

2.3 LSV 及 LMoV 侵染对百合植株酶活性的影响

受 LSV 和 LMoV 侵染的百合植株, 接种后各个生长期 SOD 活性的变化差异较大, 从接种到 15 d, 与健康对照组相比 SOD 活性明显上升, 分别平均增加了 24.6% 和 10.6%. 接种 15 d 后, SOD 活性开始下降. 在整个生长期, LSV 接种叶片中的 SOD 活性均较 LMoV 接种的增强

(图 3(a)). POD 活性从接种到 18 d 均高于健康对照组, 接种 18 d 后开始下降, 21 d 后 POD 活性与健康对照组相同. 在整个生长期, POD 活性相比健康对照组, LSV 和 LMoV 侵染株分别平均增长了 29.4% 和 18.2%, LSV 的明显高于 LMoV

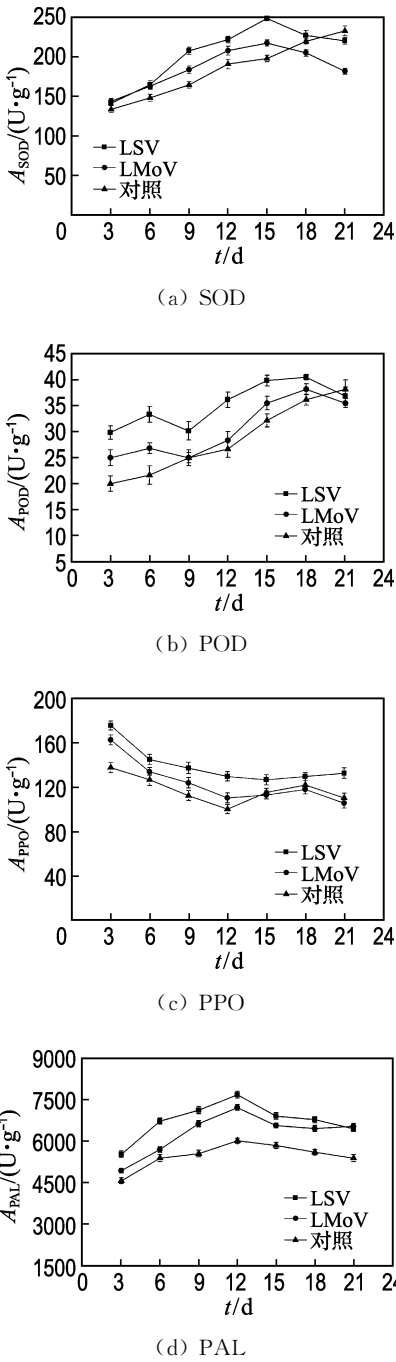


图 3 LSV 和 LMoV 侵染百合“西伯利亚” 3~21 d 的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶活性

Fig. 3 SOD, POD, PPO and PAL activities of *L. x 'Siberian'* infected 3-21d by LSV and LMoV

的. 在接种 6 d 和 18 d 时, LSV 和 LMoV 侵染株的 POD 活性均呈现两个高峰(图 3(b)). 病毒接种植株的 PPO 活性与健康对照组具有相同的变化趋势, 但比健康对照组活性高, 分别增长了 16.5% 和 9.6%. 接种 15 d 后, LMoV 侵染株的 PPO 活性变化几乎与健康对照组相同. 接种 18 d LMoV 侵染株的 PPO 活性与健康对照组一样开始下降, 而 LSV 侵染株的开始缓慢上升(图 3(c)). LSV 和 LMoV 接种植株的 PAL 活性与健康对照组相比, 在整体上呈现出较为一致的变化规律, 即接种后 3~12 d 均呈上升趋势, 接种 12~21 d 均呈下降趋势, 然而 LSV 和 LMoV 接种植株的 PAL 活性都要高于健康对照组. 在接种 12 d 时, PAL 活性达到最高值, LSV 和 LMoV 接种叶片 PAL 活性与健康对照组相比分别增长了 23.4% 和 19.6%(图 3(d)).

3 结 语

研究表明, 病毒侵染植物后会引引起植物生理功能及酶活的改变, 在通常的病毒性褪绿花叶症状中, 因为寄主细胞叶绿体结构和功能遭到破坏, 所以寄主细胞内叶绿素含量降低, 光合作用受阻^[12]. 本研究中百合受 LSV 和 LMoV 侵染后, 叶绿素的含量、气孔导度、净光合速率及胞间 CO₂ 浓度均比健康植株显著降低, 说明百合的光合作用受到抑制, 且 LSV 比 LMoV 危害的程度小, 从而可以推测 LSV 单独侵染百合时植物外部病症不明显的原因所在. 多数植物受病毒侵染后净光合速率都会下降, 并伴随气孔导度和胞间 CO₂ 浓度降低^[13]. 本研究检测结果表明受 LSV 和 LMoV 侵染的百合叶片, 净光合速率与气孔导度和胞间 CO₂ 浓度均有一定的相关性, 且与叶绿素含量的变化趋势较相似, 可以推测叶绿素含量的减少导致光合速率的下降. 为了防御外界病原物侵害, 植物体自身拥有一套完整的清除酶分子系统, 用来平衡植物细胞内活性氧的大量积累, 形成自我保护机制. 本研究百合被 LSV 和 LMoV 侵染后, 4 种抗氧化酶普遍升高, 也说明植物体内具有一定的自我保护能力, 而且百合对 LSV 的抗氧化能力比对 LMoV 的略强.

参考文献:

- [1] Zheng H Y, Chen J, Zhao M F, *et al.* Occurrence and sequences of lily mottle virus and lily symptomless virus in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province, China [J]. **Archives of Virology**, 2003, **148**(12):2419-2428.
- [2] Asjes C J, Blom-Barnhoorn G J, van Schadewijk A R. Effect of seasonal detection of lily symptomless virus and lily mottle virus on aphid-borne virus spread in *Lilium* in the Netherlands [J]. **Acta Horticulturae**, 2001, **568**:201-207.
- [3] Bertaccini A, Marani F. Electron microscopy of two viruses and mycoplasma-like organisms in lilies with deformed flowers [J]. **Phytopathologia Mediterranea**, 1982, **21**(1):8-14.
- [4] Hagita T, Sasaki J. Occurrence of necrosis of edible lily (*Lilium leichtlinii* var. *mazimowiczii* Baker) caused by mixed infection of tulip breaking virus (TBV) and unidentified filamentous virus in Hokkaido [J]. **Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan**, 1994(45):67-71.
- [5] Cohen J, Gera A, Loebenstein G. Virus diseases of lilies in Israel [J]. **Acta Horticulturae**, 1996, **432**:84-87.
- [6] Chang C A, Chen C C, Hsu H T. Partial characterization of two potyviruses associated with golden spider lily severe mosaic disease [J]. **Acta Horticulturae**, 2002, **568**:127-134.
- [7] XU Pin-san, LI Huan-gai, LIU Ji-wen, *et al.* Sequence and structure prediction of RNA-dependent RNA polymerase of lily symptomless virus isolated from *L. × 'Casablanca'* [J]. **Archives of Virology**, 2011, **156**(6):939-943.
- [8] 徐品三, 吕文霞, 夏秀英, 等. 百合无症病毒大连分离物全基因组克隆及其序列分析[J]. 植物病理学报, 2012, **42**(6):641-644.
XU Pin-san, LYU Wen-xia, XIA Xiu-ying, *et al.* Cloning and sequences analysis of the complete genome of Dalian isolate of lily symptomless virus [J]. **Acta Phytopathologica Sinica**, 2012, **42**(6):641-644. (in Chinese)
- [9] YU Li, ZHU Long-ying, WAN Yan-hui, *et al.*

- Detection of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Shanghai and study on graft inoculation [J]. **Genomics and Applied Biology**, 2009, **28**(1):115-118.
- [10] Klinkenberg F A, Ellwood S, Stanley J. Fate of African cassava mosaic virus coat protein deletion mutants after agroinoculation [J]. **Journal of General Virology**, 1989, **70**(7):1837-1844.
- [11] Balachandran S, Osmond C B, Makino A. Effects of two strains of tobacco mosaic virus on photosynthetic characteristics and nitrogen partitioning in leaves of *Nicotiana tabacum* CV. Xanthi during photoacclimation under two nitrogen nutrition regimes [J]. **Plant Physiology**, 1994, **104**(3):1043-1050.
- [12] Dubertret G, Lefort-Tran M. Functional and structural organization of chlorophyll in the developing photosynthetic membranes of *Euglena gracilis* Z. I. Formation of System II photosynthetic units during greening under optimal light intensity [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1978, **503**(2):316-332.
- [13] Reinero A, Beachy R N. Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus [J]. **Plant Physiology**, 1989, **89**(1):111-116.

Effects of LSV and LMoV infection on photosynthetic physiology and antioxidant enzymatic activity of lily

XU Pin-san*, JIANG Xu, JIA Juan

(School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Using the *Lilium oriental hybrid* ‘Siberian’ as testing material, the effects of LSV and LMoV infection on photosynthetic physiology and antioxidant enzymatic activity of the lily were analyzed. The experimental results demonstrate that the contents of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll of the lily leaves infected with LSV reduce by 15.8%, 16.6% and 11.1%, respectively, compared with the healthy leaves, and those of the lily leaves infected with LMoV reduce by 24.3%, 22.6% and 16.5%, accordingly. The net photosynthetic rate (P_n), intercellular CO_2 concentration (C_i) and stomatal conductance (G_s) of LSV infected leaves decrease by 19.2%, 13.4% and 15.1%, respectively, compared with the healthy leaves. P_n , C_i and G_s of LMoV infected leaves decrease by 50.6%, 48.2% and 29.6%. Compared with control groups, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) of the diseased lily leaves infected with LSV are enhanced by 24.6%, 29.4%, 16.5% and 23.4%, respectively, while those of the sick lily leaves infected with LMoV are 10.6%, 18.2%, 9.6% and 19.6%, respectively. It is shown that the photosynthetic physiology and antioxidant enzymatic activities of lily plant are affected by LSV and LMoV, and LMoV is more harmful than LSV in the aspect of extent of injury.

Key words: lily symptomless virus (LSV); lily mottle virus (LMoV); photosynthetic physiology; antioxidant enzymatic activity; chlorophyll