



不同抗性泡核桃对褐斑病病原菌侵染的生理生化响应

王芳, 肖玉, 糜加轩, 时羽杰, 万雪琴, 杨汉波*

(长江上游林业生态工程四川省重点实验室, 长江上游森林资源保育与生态安全国家林业和草原局重点实验室, 四川农业大学林学院, 生态林业研究所, 成都 611130)

摘要:以抗病和感病泡核桃无性系为实验材料, 人工接种褐斑病病原菌后测定不同时期叶片中保护酶活性、总酚、类黄酮、叶绿素含量等相关生理生化指标, 探讨不同抗性泡核桃响应褐斑病病原菌侵染的生理生化差异。结果表明: (1) 接种病原菌后, 感病无性系 64 叶片带菌率随着侵染时间的增加而升高, 且显著高于抗病无性系 199 ($P < 0.05$)。 (2) 抗病无性系 199 和感病无性系 64 叶片的 SOD、POD、CAT、APX 和 PPO 活性随着侵染时间均呈现先升高后降低的变化趋势, 其中 SOD、POD 和 APX 活性均在 16 d 时达到最大值; 与较感病无性系相比, 接种后抗病无性系的 POD 和 APX 活性较强; 在接种前期 (1~16 d), 感病无性系 PPO 活性高于抗病无性系, 后期 (16~34 d) CAT 活性也较抗病无性系高。 (3) 抗病无性系叶片叶绿素含量始终高于感病无性系; 抗病无性系 MDA 含量在接种后无明显变化, 而感病无性系先增加后降低, 其细胞膜脂过氧化较重。 (4) 两个无性系叶片可溶性蛋白和可溶性糖含量变化较平缓, 且差异不显著, 在接种后期 (34 d) 有升高的趋势; 接种 5 d 以后, 感病无性系叶片类黄酮和总酚含量始终显著高于抗病无性系。研究发现, 泡核桃抗病无性系叶片带菌率较低, 较难受到侵染, 并且通过提高 POD 和 APX 活性以及积累较多叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖来应对病原菌侵染引起的氧化胁迫, 抑制病原菌的繁殖, 从而提高其抗病能力。

关键词:泡核桃; 褐斑病; 防御酶; 酚类物质; 渗透调节物质; 叶绿素

中图分类号: Q945.78; S664.1 **文献标志码:** A

Physiological and Biochemical Responses of Different Resistant Walnuts to Brown Spot Infection by *Ophiognomonia leptostyla*

WANG Fang, XIAO Yu, MI Jiaxuan, SHI Yujie, WAN Xueqin, YANG Hanbo*

(Sichuan Provincial Key Laboratory of Ecological Forestry Engineering on the Upper Reaches of the Yangtze River & National Forestry and Grassland Administration Key Laboratory of Forest Resources Conservation and Ecological Safety on the Upper Reaches of the Yangtze River, Institute of Ecology & Forestry, College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To explore the differences in physiological and biochemical changes of different resistant walnut clones in response to brown spot pathogen infection, we used resistant and susceptible clones as experimental materials. After inoculation with *Ophiognomonia leptostyla*, the related physiological and biochemical indexes such as protective enzyme activity, total phenol, flavonoids, and chlorophyll content in

收稿日期: 2022-06-15; 修改稿收到日期: 2022-10-26

基金项目: 四川省重点研发项目 (2021YFYZ0032); 四川省科技计划项目 (2020YFN0058)

作者简介: 王芳 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事核桃生理生化研究。E-mail: 2229311722@qq.com

* 通信作者: 杨汉波, 博士, 讲师, 主要从事林木遗传改良相关研究。E-mail: yanghanbo6@sicau.edu.cn

walnut leaves at different stages were determined. The results showed that: (1) after inoculation, the leaf carrier rates of susceptible clone 64 increased all the time, and was significantly higher than that of disease-resistant clone 199($P<0.05$). (2) The activities of SOD, POD, CAT, APX and PPO in the leaves of disease-resistant clone 199 and susceptible clone 64 declined after rising. SOD, POD and APX all reached the maximum on the 16th day. Compared with the susceptible clones, the POD and APX activities of the resistant clones were stronger after inoculation, and the PPO activity of the susceptible clones was higher than that of the resistant clones in the early stage (1~16 d), and the CAT activity in the later stage (16~34 d) was also higher. (3) The leaf chlorophyll content of disease-resistant clone was always higher than that of susceptible clone; the MDA content of disease-resistant clones had no significant change after inoculation, while that of susceptible clones increased at first and then decreased, indicating that the cell membrane lipid peroxidation was more serious. (4) The contents of soluble protein and soluble sugar in the leaves of the two clones changed slowly, and the difference was not significant, and there was an increasing trend in the later stage of inoculation (34 days). After 5 days of inoculation, the contents of flavonoids and total phenols in leaves of susceptible clones were significantly higher than those of disease-resistant clones. It was found that the leaf carrier rate of disease-resistant clones of walnut was low and it was difficult to be infected. Meanwhile, the ability of disease resistance was improved by increasing the activities of POD and APX and accumulating more chlorophyll, soluble protein and soluble sugar to deal with the oxidative stress caused by pathogen infection and inhibit the reproduction of pathogens.

Key words: *Juglans sigillata*; brown spot disease; defensive enzyme; phenolics; osmoregulatory substance; chlorophyll

核桃是胡桃科(Juglandaceae)胡桃属(*Juglans*)所有种的种子的统称,具有很高的营养价值和保健作用,在中国各地广泛栽植^[1-2]。泡核桃(*Juglans sigillata*)是核桃中的一种,是中国山区重要的经济林树种,主要种植于西南部及中部地区,该品种种植单一,管理粗放,病害问题日益严重^[3]。褐斑病是危害核桃的三大病害之一,爆发性较强、遍布范围极广,而且严重危害核桃的叶片、嫩梢和果实,严重降低核桃产量和质量^[4-5]。此外,使用化学药品对核桃褐斑病进行防治会使病原菌产生抗药性,也会污染环境,并且农药残留会增加食品风险。因此,采用抗病品种无疑是最安全有效的方法,培育和推广抗病品种是防治褐斑病的最有效、最经济的绿色途径之一。而明确不同抗性核桃品种对褐斑病的抗性生理机制,对防治褐斑病的发生、品种利用以及制定有效的抗病育种策略具有重要意义。研究表明,植物遭受病原菌侵染后会产生大量活性氧(ROS),抑制植物叶绿体发育,造成细胞膜脂过氧化,致使细胞死亡;为减轻 ROS 对细胞的损害,植物体内会发生复杂的生理生化反应,产生多种物质,清除体内过多的 ROS,抵抗病原菌的入侵,增强植物的抗性^[6-7]。这些物质包括过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、多酚氧化酶(polyphenol ox-

idase, PPO)等防御酶及非酶类物质(叶绿素、总酚等),并且这些物质的变化与植物的抗病性有关^[8-10]。例如,水稻遭受白发病侵染后,抗病品种中抗氧化酶活性及可溶性糖含量升高且显著高于感病品种^[11];灰霉病侵染苹果时抗病品种中类黄酮和木质素含量显著高于感病品种^[12];抗病马铃薯抵抗疮痂病侵染过程中 POD 和 PPO 活性逐渐升高,这两种酶活性与马铃薯抗病性呈正相关关系^[13];向日葵感染根盘菌后,抗病品种中可溶性蛋白含量降低,但仍显著高于感病品种,MDA 含量与抗病性呈负相关^[14]。由此可见,植物遭受逆境胁迫后的生理生化指标变化与植物的抗病性有一定的关系。

据报道,引起核桃褐斑病的病原菌种类复杂多样,核桃日规壳(*Ophiognomonia leptostyla*)就是引起褐斑病的病原菌之一,学者对该病原菌与核桃的反应机制、感病后核桃酚类物质含量的变化以及该病原菌的繁殖特性等进行了研究^[4,15-16],但主要是围绕黑核桃(*Juglans nigra*)和英国核桃(*Juglans regia*)等展开,缺少与泡核桃相关报道。而缺乏泡核桃品种抗病性选择相关的策略,极大程度限制了泡核桃抗病育种的进程。研究寄主植物受病原菌侵染后的生理生化变化,对揭示植物抗性生理基础有着重要意义。2020 年,本课题组首次从泡核桃病叶中分离、鉴定得到核桃日规壳病原菌,并验证其是导致泡核桃褐斑病的主要致病菌^[17-18],目前尚缺乏泡

核桃抵抗该病原菌侵染的生理生化反应的相关研究。鉴于此,本研究以抗、感褐斑病的泡核桃无性系为实验材料,考察了褐斑病病原菌侵染对不同抗性无性系叶片中抗氧化酶活性及叶绿素、总酚等含量的影响,探讨不同抗病性泡核桃对褐斑病原菌响应的差异,以期为揭示泡核桃抗褐斑病的生理机理、泡核桃抗病机理研究和抗病品种选育及遗传改良提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料和菌株

供试植物材料为 4 年生抗病(199)和感病(64)泡核桃(*Juglans sigillata*)无性系。供试菌株为本课题组前期从泡核桃褐斑病斑分离、鉴定的核桃日规壳(*Ophiognomonina leptostyla*)SICAUCC 20-0012 菌株^[17-18]。

1.2 实验设计与生理指标测定

1.2.1 孢子悬浮液的制备 在超净工作台内,将培养 10 d 左右的核桃日规壳菌株倒入少量无菌水,用无菌玻璃棒轻轻刮下孢子,再用孔径为 75 mm 的无菌尼龙布过滤掉菌丝及其他杂质,使用血球计数板,将孢子悬浮液的浓度调至 10^7 个/mL,备用。

1.2.2 接种方法 将配置好的分生孢子悬浮液装入喷壶中,采用针刺喷洒接种法对健康、无缺陷的叶片进行接种(图 1)。接种前叶片用 0.6% 的次氯酸钠消毒、灭菌,无菌水冲洗,接种后叶片用塑料袋密封保湿 24 h。抗病和感病无性系均接种 6 株(6 个生物学重复),同时抗病和感病无性系均设置空白对照(6 株,接种无菌水),总共 24 株。每株东南西北四个方向各接种 10 枝,每个枝上除了顶端、末端的叶片,其他成熟叶片均接种。分别在接种后 1、5、9、16、27 和 34 d 采集核桃叶片。每个时间点,每株上取长势一致的 5 片叶片混合为 1 个样品。所有的样

品液氮速冻, -80 ℃ 保存备用,用于后续生理生化指标测定。

1.2.3 叶片带菌率调查计算 将新鲜叶片用无菌解剖刀切割为 1 cm×1 cm 的方块,置于含有 1.5 g/L 三氯乙酸[V(乙醇):V(氯仿)=3:1]的脱色液中脱色 24 h,期间更换脱色液 2 次至脱色液不再变色,然后将脱色后的叶片转入饱和水合氯醛(2.5 g/mL)中透明 24 h。待组织透明后用水洗净,经稀苯胺蓝的水溶液(0.01 g/mL)染色 5 min,用甘油做浮载剂于显微镜 OLYMPUS BX51 下观察、记录^[19]。统计不同时期单张叶片的病原菌数量(每个无性系 10 张叶片),最后计算叶片单位面积病原菌数量,即单位面积带菌率(个/cm²)。

1.2.4 生理生化指标测定 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑光还原法;过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定采用紫外比色法^[20]。过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法^[21]。苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定采用反式肉桂酸升高速率计算的方法;多酚氧化酶(PPO)活性测定采用邻苯二酚比色法^[22]。

丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法;可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法;可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法;叶绿素含量测定采用丙酮法^[21]。类黄酮含量测定采用甲醇法^[23]。总酚含量参照总酚提取试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行提取,并采用紫外分光光度计测定吸光度值,根据公式计算含量。每个生理生化指标重复测定 3 次,取其平均值。

1.3 数据处理

采用 Excel 2010 进行数据整理,SPSS 26.0 软件进行统计分析,对不同时期下的数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),并采用最小显著差异法



A 为处理组接种;B 为空白对照组接种

图 1 接种方法示意图

A represents the inoculation of the resistant/susceptible clone treatment group, B represents the blank control group

Fig. 1 Graphical explanation of inoculation method

(LSD) 进行多重比较检验差异显著性。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行可视化作图。文中所得数据均以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 接种后两个泡核桃无性系叶片带菌率比较

表 1 显示,接种褐斑病病原菌后,泡核桃抗病无性系 199 叶片带菌率在各时间段内均显著低于感病无性系 64($P<0.05$)。同时,在整个侵染时段内,抗病无性系 199 叶片带菌率无明显变化,带菌率在 $3.45\sim3.93$ 个/ cm^2 之间;而感病无性系 64 在接种 9 d 后叶片带菌率显著上升,34 d 时带菌率最高 (10.27 个/ cm^2)。可见,泡核桃感病无性系叶片表面更有利于病原菌生长和繁殖,叶片带菌率显著较高。

2.2 接种病原菌对泡核桃无性系叶片防御酶活性的影响

2.2.1 抗氧化酶活性 在接种病原菌后,泡核桃抗、感病无性系叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)及抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性均随着侵染时间的增加表现出先升高后降低的趋势,且它们的 SOD、POD 和 APX 活性均在 16 d 时达到最高,抗、感病无性系分别为 $198.04/237.26, 354.45/145.48$ 和 $0.23/0.17$ U/g,而 CAT 活性则分别在接种后 16 d 和 27 d 达

到最大值(图 2)。其中,抗病无性系接种和对照处理叶片的 SOD 活性始终低于相应的感病无性系,并且大多时期存在显著差异($P<0.05$);与对照相比,感病无性系叶片 SOD 活性在接种后 1 d、5 d 时显著降低,而抗病无性系则在接种 9、24 d 时显著增加,34 d 时显著降低,它们在其余时间段均无显著变化。同时,抗病无性系接种和对照处理叶片 POD 和 APX 活性在各时段也均不同程度地高于感病无性系,并且大多时期存在显著差异($P<0.05$);与对照相比,感病无性系 POD 活性在接种后 1 和 34 d 显著降低,在 9~16 d 显著升高,其 APX 活性在接种 5~16 d 均显著升高,其余时段无显著变化;抗病无性系 POD 活性在接种后 9 d 比对照显著降低,在 16~34 d 均显著升高,其 APX 活性在接种 5~9 d 均显著升高,在接种 34 d 显著降低,其余时段无显著变化。另外,接种病原菌后,感病无性系 CAT 活性在接种 5 d 显著低于相应抗病无性系,在接种 9~34 d 均显著高于抗病无性系;与对照相比,感病无性系 CAT 活性在接种 1~5 d 时显著降低,在接种 16~34 d 显著升高,而抗病无性系 CAT 活性在接种 5 和 34 d 显著降低,在接种 9 和 27 d 显著升高。可见,接种褐斑病菌均会使两个无性系叶片内抗氧化酶活性发生不同方向、不同程度的变化。

2.2.2 PPO 和 PAL 活性 图 2 显示,两个无性系对照组叶片中的 PAL 活性在整个接种期间没有发生明显变化,抗病无性系叶片 PAL 活性只有在接种 5 d 时才显著高于感病无性系($P<0.05$),其余时间无差别;两无性系各时期接种组与对照组之间也均无显著差异。抗、感无性系接种后 PPO 活性均呈现先上升后下降的趋势,且感病无性系 PPO 活性达到峰值的时间较早。其中,在接种初期(1~9 d),感病无性系 PPO 活性逐渐增加,并在接种 9 d 时达到最大值后急速下降,并且感病无性系 PPO 活性在接种 5 和 9 d 时显著高于对照组,其余时间段无显著变化;而抗病无性系 PPO 活性在接种前期(1~16 d)无明显变化,并于 27 d 时急剧上升达到最大值 ($85.8\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$),且显著高于感病无性系。可见,两个泡核桃无性系均能通过增强 PPO 活性对病原菌进行响应,而其 PAL 活性无显著变化。

2.3 接种病原菌对泡核桃无性系叶片丙二醛(MDA)含量的影响

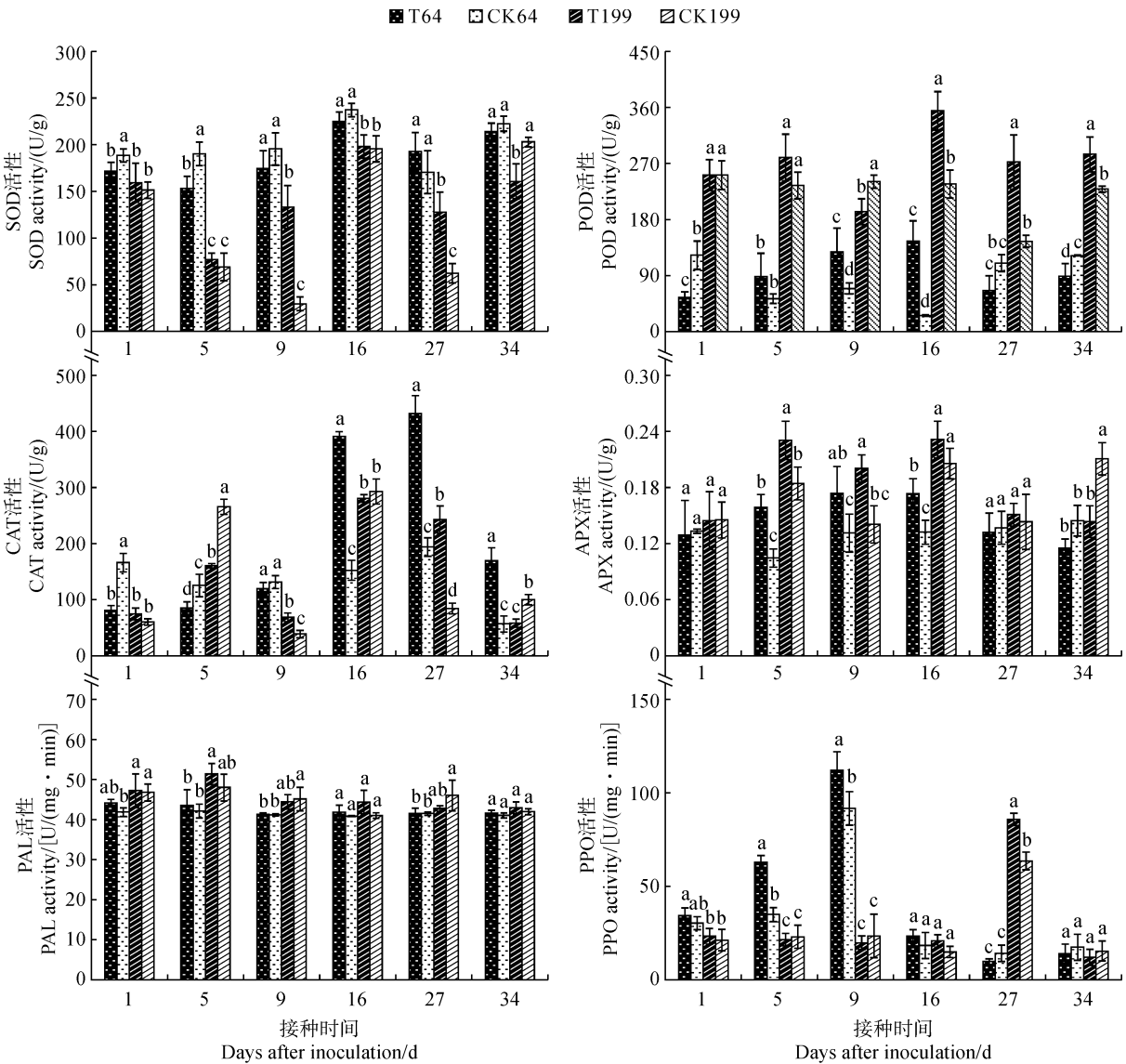
如图 3 所示,在接种核桃褐斑病病原菌后,泡核桃抗病无性系叶片 MDA 含量变化比较平缓,且仅在接种 5 d 时显著低于对照,其余时期与对照组均无

表 1 接种后两个泡核桃无性系叶片带菌率变化情况
Table 1 Changes in leaf carrier rate of two walnut clones after inoculation

接种时间 Day after inoculation/d	叶片带菌率 Leaf carrier rate(Spores/cm ²)	
	感病无性系 64 Susceptible clone 64	抗病无性系 199 Resistant clone 199
1	5.50±0.62Da	3.67±0.57Ab
5	5.46±0.49Da	3.73±0.25Ab
9	5.69±0.57CDa	3.93±0.05Ab
16	6.77±1.27Ca	3.45±0.25Ab
27	8.31±0.37Ba	3.85±0.60Ab
34	10.27±0.26Aa	3.92±0.11Ab

注:相同无性系内不同大写字母表示在不同时间段间差异显著($P<0.05$),而相同时间内不同小写字母表示不同无性系间差异显著($P<0.05$),下同

Note: Different capital letters within same column indicate significant differences in different time period ($P<0.05$), while different lowercase letters within same time period indicate the significant difference between different clones, ($P<0.05$); the same as below



T₁₉₉、CK₁₉₉、T₆₄、CK₆₄ 分别表示抗病无性系 199 和感病无性系 64 接种处理和对照;误差棒指的是平均值的标准误;

同期不同小写字母表示处理间在 0.05 水平存在显著性差异;下同

图 2 抗感无性系接种病原菌核桃叶片后防御酶活性变化

T₁₉₉、CK₁₉₉、T₆₄ and CK₆₄ stand for the inoculation treatment and control of resistant clone 199 and susceptible clone 64, respectively; Error stick refers to the standard error of average value. The different normal letters in the same time indicate significant difference between treatment group and blank control group at 0.05 level; the same as below

Fig. 2 Changes of defense enzyme activities in walnut leaves after inoculation of resistant/susceptible clones with pathogens

显著差异,其在接种 34 d 时达到峰值。感病无性系叶片 MDA 含量在接种后先增加后降低,在接种 5 d 时达到峰值(5.48 mmol/g)并显著高于同期对照,而在 34 d 时显著低于对照。感病无性系叶片 MDA 含量在接种后 1~9 d 显著高于抗病无性系,在接种 16~27 d 无显著差异,在接种 34 d 显著低于抗病无性系。可见,泡核桃抗病无性系 199 叶片 MDA 含量在遭受病原菌侵染后不会发生显著变化,感病无性系叶片 MDA 含量则会在接种初期显著增加,并

显著高于抗病无性系,其达到峰值的时间明显早于抗病无性系。

2.4 接种病原菌对泡核桃无性系叶片叶绿素含量的影响

由图 4 可知,泡核桃抗、感无性系叶绿素含量在接种褐斑病原菌后均呈现先增加后降低的趋势,且抗病无性系在整个侵染时期始终高于感病无性系且大多差异显著;抗、感病无性系叶绿素含量分别于接种 27 d 和 9 d 含量达到峰值,分别为 3.84 和 2.74

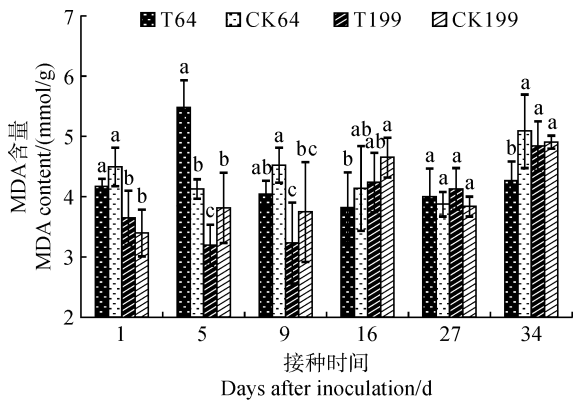


图 3 抗感无性系接种病原菌后核桃叶片 MDA 含量的变化

Fig. 3 Changes of MDA content in resistant/susceptible clones after inoculation in walnut leaves with pathogens

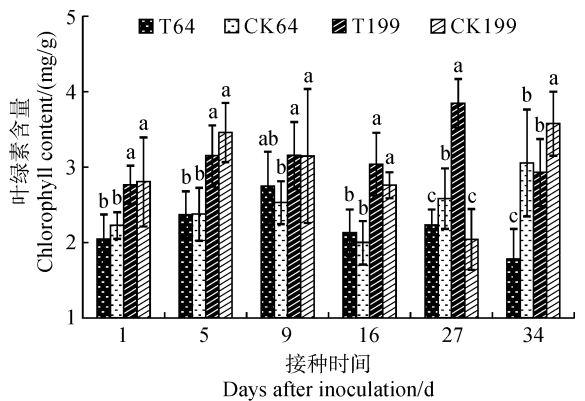


图 4 抗/感无性系接种病原菌核桃叶片后叶绿素含量的变化

Fig. 4 Changes in chlorophyll content of resistant/sensitive clones after inoculation in walnut leaves with pathogens

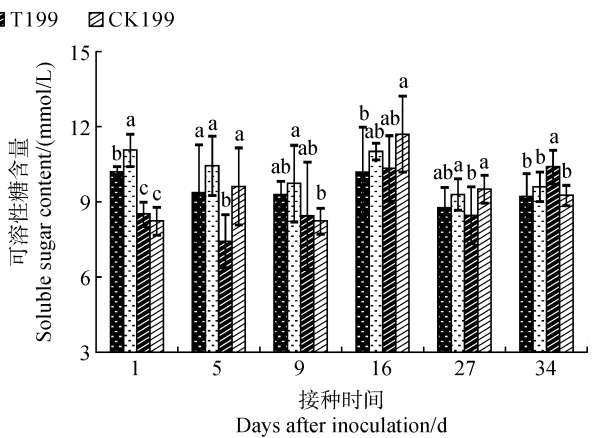
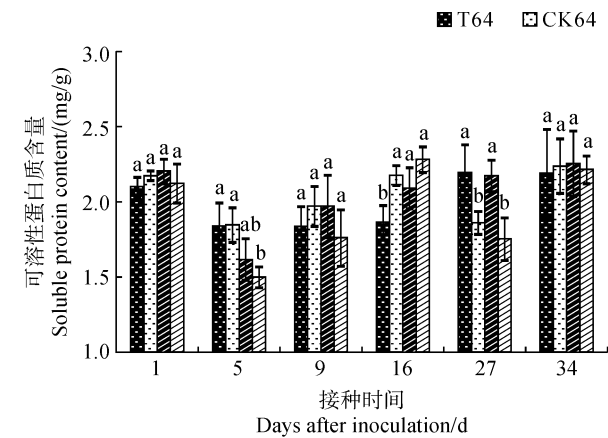


图 5 抗/感无性系接种病原菌后核桃叶片渗透调节物质含量的变化

Fig. 5 Changes of osmotic adjustment substances in resistant/susceptible clones after inoculation in walnut leaves with pathogens

mg/g,即抗病无性系达到峰值的时间较晚、峰值较高。与对照相比,抗、感无性系叶绿素含量在接种 1~16 d 均与对照无显著差异,感病无性系在接种 27~34 d 显著低于对照,抗病无性系在接种 27 d 显著高于对照,在 34 d 时显著低于对照。可见,病原菌侵染后期会显著降低泡核桃感病无性系叶绿素含量,却会诱导抗病无性系叶绿素合成,提高叶绿素含量,以利于其抵抗病原菌的入侵。

2.5 接种病原菌对泡核桃无性系叶片渗透调节物质含量的影响

如图 5 所示,泡核桃抗、感病无性系叶片可溶性蛋白含量在接种病原菌后均呈现先降低后增加的趋势,且两个无性系均在接种 34 d 达到峰值;抗病无性系叶片可溶性蛋白含量在接种 27 d 时显著高于同期对照($P<0.05$),其余时间无显著变化,而感病无性系在接种 16 d 时显著低于其对照组,接种 27 d

时显著高于其对照组,其余时期无差别;抗、感无性系叶片可溶性蛋白在接种 16 d 时存在显著差异,且抗病无性系显著高于感病无性系($P<0.05$)。同时,接种病原菌后,抗病无性系叶片可溶性糖含量在接种 1 和 5 d 显著低于感病无性系,34 d 显著高于感病无性系;与对照组相比,抗病无性系可溶性糖含量在接种 5 和 27 d 显著降低,在 34 d 显著升高,而感病无性系可溶性糖含量在接种 1 d 显著降低,其余各时期变化并不显著。可见,病原菌侵染后期均会使泡核桃抗、感病无性系积累少量可溶性蛋白和可溶性糖,增强植物的抗病性,参与抵抗病原菌的侵染过程。

2.6 接种病原菌对泡核桃无性系叶片酚类等抑菌相关物质含量的影响

图 6 显示,接种后 5~34 d,泡核桃抗病无性系叶片的类黄酮含量均显著低于相应的感病无性系

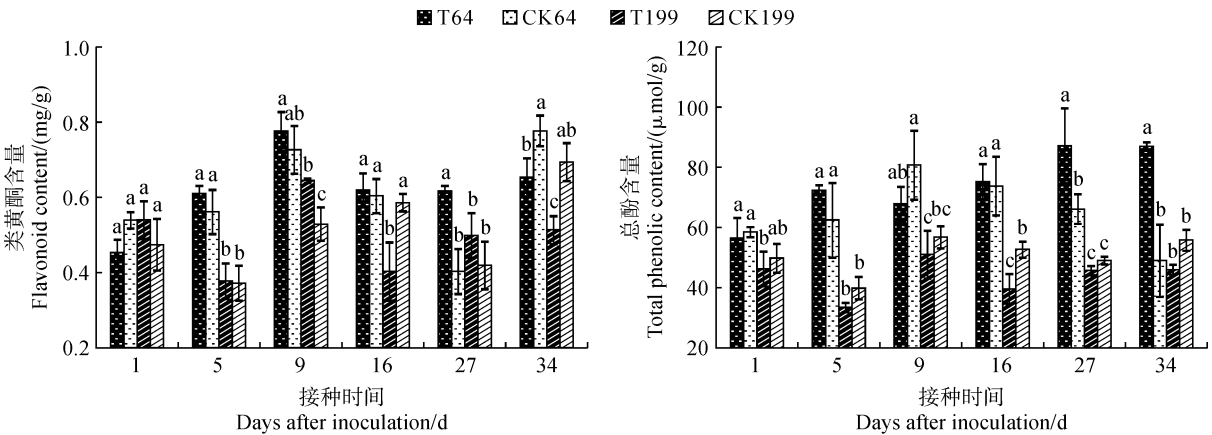


图6 抗/感无性系接种病原菌后酚类抑菌物质含量的变化

Fig. 6 Changes in the contents of phenolic antibacterial substances after inoculation with pathogens bacteria in resistant/susceptible clones

($P<0.05$),且抗、感两个无性系叶片类黄酮含量均在接种9 d时达到峰值,分别为0.64和0.78 mg/g;与对照组相比,抗病无性系类黄酮含量在接种9 d时显著升高,在接种16和34 d时显著降低,而感病无性系在接种27 d时显著升高,34 d时显著降低,其余时间段无显著变化(图6)。同时,接种后抗病无性系叶片总酚含量始终显著低于相应的感病无性系($P<0.05$);抗病无性系接种后总酚含量整体变化不大,在接种9 d达到峰值(51.01 mg/g),而感病无性系的总酚含量呈现上升趋势,在接种27 d时达到峰值(87.11 mg/g)。与对照组相比,抗病无性系接种16 d时显著降低,而感病无性系接种27和34 d时显著升高。可见,病原菌更容易诱导感病无性系64产生较多的总酚和类黄酮,抑制病原菌的繁殖。

3 讨论

酶的防御反应作用是植物抵抗病原菌侵染的最基本反应,研究表明超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等防御酶对植物的抗病性有重要作用^[24-26]。例如,SOD可以将细胞内的 O_2^- 还原为 H_2O_2 ,POD和CAT能将 H_2O_2 降解为无毒害的 H_2O 和 O_2 ,减少 H_2O_2 对细胞的毒害作用^[26-27];PAL和PPO可以通过苯丙烷代谢途径直接或者间接地产生一系列抑菌物质(单宁、类黄酮、木质素等)阻止病原菌的生长和繁殖^[28-29],这些酶活性的高低是植物诱导抗性产生的重要标志之一。本研究结果表明,接种核桃褐斑病病原菌后,随着侵染时间的延长,抗感两个泡核桃无性系叶片的SOD、POD、CAT、APX和PPO

活性均呈现先升高后降低的趋势,说明病原菌侵染激活了泡核桃的抗氧化机制,诱导防御酶活性升高;而当有毒有害物质积累较多,超出防御酶的清除能力时,防御酶活性下降。其中,泡核桃叶片SOD、POD和APX活性均在接种褐斑病病原菌16 d时达到最大值,说明泡核桃抗氧化酶系统在病原菌侵染胁迫16 d时有较高清除ROS的能力。同时,泡核桃抗病无性系199的POD和APX活性均高于感病无性系64,说明抗病无性系可通过提高自身POD和APX的活性以清除病原菌侵染产生的大量ROS,减轻ROS对细胞的损伤,这与山核桃对松针刺盘孢菌侵染的响应趋势一致^[30],表明POD和APX活性与泡核桃褐斑病抗性紧密相关。此外,在接种前期(1~16 d),泡核桃感病无性系叶片PPO活性逐渐增加且较抗病无性系变化明显,这是由于感病无性系受到病原菌侵害后,病情较抗病无性系严重,而其POD和APX活性却相对较低,需要大量的PPO参与拮抗病原菌进一步繁殖以缓解症状;而在病原菌侵染后期(9~34 d),感病无性系叶片CAT活性高于抗病无性系,可能是由于其叶片内病原菌快速繁殖及PPO活性降低,就通过提高CAT活性来减少植物受损害程度。另外,泡核桃抗病无性系PAL活性只在接种5 d时才显著高于感病无性系,其余时间并无显著变化,抗病无性系可能仅在接种5 d时激活了体内PAL产生途径来对病原菌进行响应,且PAL与病原菌的响应机制关系并不明显,表明PAL与泡核桃对褐斑病的抗病性关系不大。

植物受到病原物侵染时,会通过苯丙烷类代谢途径合成木质素、类黄酮、植保素等抗菌物质,参与

抵抗生物或微生物胁迫^[31]。总酚和类黄酮是苯丙烷代谢途径产生的能够抑制病原菌生长和繁殖的物质,其含量的高低与植物的抗病性也有一定关系^[12,28,32]。本研究中,接种褐斑病病原菌 16 d 以后,泡核桃感病无性系 64 叶片类黄酮和总酚含量高于抗病无性系 199,说明感病无性系在受到褐斑病侵染后,可能通过增加叶片中总酚和类黄酮含量对病原菌进行响应,减少自身细胞损伤程度。而 PPO 可以通过苯丙烷类代谢途径产生这两种物质,接种后感病无性系叶片 PPO 活性也增加,可以将 PPO 及其相关代谢物质(类黄酮、总酚)的变化看作是植株感病后组织内部发生的“生化症状”,这种内部“生化症状”和外部病症是统一的^[33]。所以,可以利用感病无性系染病后 PPO 活性升高、类黄酮和总酚含量变化大,而抗病无性系变化小的特点,作为筛选抗病品种的指标。另外,接种褐斑病病原菌后,泡核桃感病无性系 64 叶片表面病原菌的数量始终增加并且显著多于抗病无性系 199,表明感病无性系更有利于病原菌生长繁殖和入侵,叶片的防御系统不能有效抵御病原菌入侵,从而加重叶片损害程度,因此就需要产生较多的总酚和类黄酮来抑制病原菌的繁殖,故类黄酮和总酚含量也相对较高。本研究仅对叶片表面的病原菌数量进行了观察,而抗病和感病无性系叶片内部是否有病原菌的入侵或繁殖尚不清楚,可能侵入叶片内部的病原菌对核桃的抗性影响更大,所以病原菌与核桃互作的机制还有待于进一步研究探讨。

植物在逆境胁迫下的细胞膜损伤可以根据受影响组织中丙二醛(MDA)的含量来判断,MDA 在植物抗性方面已有很多研究,与植物抗病性呈负相关关系,含量越高说明细胞损伤越严重^[11,34-35]。本实验中,泡核桃抗病无性系接种褐斑病病原菌后 MDA 含量并无明显变化,可能是由于其叶片产生的一些生理活性物质或防御酶及早地发挥作用,具有较强的清除 ROS 的能力,引起生物膜损伤的程度小,增加了其抗性;而感病无性系 64 在病原菌侵染后叶片 MDA 含量增加,是由于发挥防御作用的酶

活性较低,不能及时清除过量 ROS,使细胞膜脂过氧化严重。

此外,植物的光合作用离不开叶绿素,而叶绿素含量的高低又与植物抗病性紧密相关,大量研究结果均表明叶绿素含量越高,植物的抗病性就越强^[36-37]。本研究发现,接种褐斑病病原菌后,泡核桃抗病无性系叶片叶绿素含量始终高于感病无性系,且达到峰值的时间较晚。说明病原菌侵染后,抗病无性系叶片会积累大量叶绿素,增强自身的光合作用效率,合成较多有机物质提高自身新陈代谢速度,增强植物的抗性;而感病无性系的自我调节能力低于抗病无性系,叶绿素合成途径受阻,叶片损伤严重,表现出明显的病症,进一步证明叶绿素含量的变化与植物抗病性有关。另外,可溶性糖和可溶性蛋白质是植物体内重要的渗透调节物质,在植物的抗病性方面发挥着重要作用^[27,31,38]。本研究发现,泡核桃接种褐斑病病原菌后可溶性蛋白和可溶性糖含量变化较平缓,且差异并不明显;在接种后期抗、感病两个无性系可溶性蛋白和可溶性糖含量逐渐增加,说明病原菌侵染后期才会影响植物的渗透调节系统,增加这两种调节物质积累,抵抗病原菌的入侵,且这两种物质含量的高低与泡核桃的抗病性强弱无关。

综上所述,褐斑病病原菌侵染会影响抗、感泡核桃叶片的生长发育、抗氧化系统和渗透调节系统的功能。接种褐斑病病原菌后,泡核桃感病无性系更容易受到病原菌侵染,其叶片表面病原菌的数量始终增加并且显著多于抗病无性系。抗病无性系通过增加 SOD、POD、APX 和 PPO 的活性以及积累较多叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖进而抵御病原菌的侵染;感病无性系通过提高 CAT 和 PPO 活性来增加总酚及类黄酮含量,从而减轻自身过氧化程度,抑制病原菌生长。这些均表明抗、感泡核桃无性系应答核桃日规壳病原菌胁迫的生理生化反应各不相同,在今后的研究中还应从遗传、分子角度等深入研究泡核桃的抗病机理,进一步从基因水平上解析泡核桃的抗病机制。

参考文献:

[1] 何 莉,路玉祥. 核桃及其栽培新技术[J]. 现代园艺, 2018, (21): 56-57.
HE L, LU Y X. Walnut and its new cultivation techniques [J]. *Xiandai Horticulture*, 2018, (21): 56-57.

[2] 刘 警,于秋香,李 扬,等. 我国核桃生产的现状、问题及发展对策[J]. 北方果树, 2020, (6): 38-41.
LIU J, YU Q X, LI Y, *et al.* Current situation, problems and development countermeasures of walnut production in China[J]. *Northern Fruits*, 2020, (6): 38-41.

- [3] 陈丽华, 张家恒, 吴毅歆, 等. 泡核桃干腐病原菌分离鉴定及杀菌剂室内筛选[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2016, **31**(4): 624-629.
CHEN L H, ZHANG J H, WU Y X, *et al.* Identification of the pathogen causing canker on *Juglans sigillata* L. and indoor screening of fungicides[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2016, **31**(4): 624-629.
- [4] 朱英芝, 廖旺姣, 邹东霞, 等. 核桃褐斑病研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, **33**(1): 222-227.
ZHU Y Z, LIAO W J, ZOU D X, *et al.* Research advance in walnut anthracnose[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, **33**(1): 222-227.
- [5] 杨 莉, 杨双昱, 麻文建, 等. 核桃褐斑病原菌的分离鉴定和发病规律的调查[J]. 林业科学研究, 2017, **30**(6): 1 004-1 008.
YANG L, YANG S Y, MA W J, *et al.* Identification of pathogen of walnut brown spot and investigation of the disease occurrence[J]. *Forest Research*, 2017, **30**(6): 1 004-1 008.
- [6] ARORA A, SAIRAM R, SRIVASTAVA G. Oxidative stress and antioxidative system in plants[J]. *Current Science: A Fortnightly Journal of Research*, 2002, **82**(10): 1 227-1 238.
- [7] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, **48** (12): 909-930.
- [8] 丁玉梅, 张 杰, 谢俊俊, 等. 枯萎病菌胁迫下 3 种黑籽南瓜 HQRGA2 表达及抗氧化酶活性差异分析[J]. 植物生理学报, 2019, **55**(3): 349-358.
DING Y M, ZHANG J, XIE J J, *et al.* Expression analysis of HQRGA2 and differences of anti-oxidant enzymes in three varieties of *Cucurbita ficifolia* under stress of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, **55**(3): 349-358.
- [9] MÖLLER P A, AUCIQUE-PÉREZ C E, EINHARDT A M, *et al.* Impairment of photosynthetic capacity and hydrogen peroxide removal in castor bean affected by bacterial leaf spot [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2020, **111**: 101-110.
- [10] 刘鑫铭, 郭汝凤, 刘 奕, 等. 内生真菌侵染对化感物质胁迫下木麻黄幼苗根系活性氧代谢及保护酶系统的影响[J]. 植物生理学报, 2020, **56**(9): 1 985-2 006.
LIU X M, GUO R F, LIU Y, *et al.* Effects of endophyte infection on reactive oxygen metabolism and protective enzyme system of *Casuarina equisetifolia* seedlings under allelopathic stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, **56**(9): 1 985-2 006.
- [11] 韩彦卿, 王 鹤, 王慧娜, 等. 谷子抵御白发病菌侵染的生理生化及基因表达分析[J]. 植物病理学报, 2020, **50**(6): 657-665.
HAN Y Q, WANG H, WANG H N, *et al.* Physiological, biochemical and gene expression analysis of foxtail millet against infection of *Sclerospora graminicola*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, **50**(6): 657-665.
- [12] 唐永萍, 石亚莉, 贺军花, 等. 不同灰霉病抗性苹果果实中酚类物质代谢特征[J]. 西北植物学报, 2017, **37**(3): 510-516.
TANG Y P, SHI Y L, HE J H, *et al.* Phenolic metabolism of apple fruit with different grey mold disease resistance[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(3): 510-516.
- [13] 刘淑娜, 金光辉, 李 鑫, 等. 不同抗性马铃薯品种接种疮痂病菌后生理生化特性的变化[J]. 西南农业学报, 2019, **32** (12): 2 815-2 819.
LIU S N, JIN G H, LI X, *et al.* Changes of physiological characteristics in potato varieties with different resistance affected by potato common scab[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2019, **32**(12): 2 815-2 819.
- [14] LIU J, ZHANG Y H, MENG Q L, *et al.* Physiological and biochemical responses in sunflower leaves infected by *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2017, **100**: 41-48.
- [15] MEDIC A, SOLAR A, HUDINA M, *et al.* Phenolic response to walnut anthracnose (*Ophiognomonia leptostyla*) infection in different parts of *Juglans regia* husks, using HPLC-MS/MS[J]. *Agriculture*, 2021, **11**(7): 659.
- [16] POLLEGIONI P, VAN DER LINDEN G, BELISARIO A, *et al.* Mechanisms governing the responses to anthracnose pathogen in *Juglans* spp. [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, **159**(4): 251-264.
- [17] YANG C, LIU F, ZENG Q, *et al.* Brown leaf spot of *Juglans* hybrid caused by *Ophiognomonia leptostyla* in China [J]. *Plant Disease*, 2021, **105**(11): 3 740.
- [18] YANG C, DENG Y, WANG F, *et al.* Brown leaf spot on *Juglans sigillata* caused by *Ophiognomonia leptostyla* in Sichuan, China[J]. *Plant Disease*, 2021, **105**(12): 4 160.
- [19] 张晓林, 张俊娥, 贺璞慧中, 等. 胶孢炭疽菌侵染杨树叶片的组织病理学研究[J]. 北京林业大学学报, 2018, **40**(3): 101-109.
ZHANG X L, ZHANG J E, HE P H Z, *et al.* Histopathology study of poplar leaves infected by *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2018, **40**(3): 101-109.
- [20] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [21] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [22] 孙红梅, 李天来, 李云飞. 低温解除休眠过程中兰州百合鳞茎酚类物质含量及相关酶活性变化[J]. 中国农业科学, 2004, **37**(11): 1 777-1 782.
SUN H M, LI T L, LI Y F. Changes of phenols content and activity of enzymes related to phenols in lily bulbs stored at different cold temperatures for breaking dormancy[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, **37**(11): 1 777-1 782.
- [23] TARKOWSKI P, VAN DE POEL B, HÖFTE M, *et al.*

Sweet immunity: Inulin boosts resistance of lettuce (*Lactuca sativa*) against grey mold (*Botrytis cinerea*) in an ethylene-dependent manner[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(5): 1 052.

[24] 许珂, 王萍, 崔晓伟, 等. 籽用美洲南瓜叶片对白粉病菌的抗逆生理响应[J]. *西北植物学报*, 2021, **41**(10): 1 673-1 680.

XU K, WANG P, CUI X W, *et al.* Physiological response of *Cucurbita pepo* L. leaves to powdery mildew[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(10): 1 673-1 680.

[25] 关峰, 张景云, 石博, 等. 苦瓜枯萎病抗性鉴定及枯萎病菌胁迫下生理响应差异分析[J]. *植物生理学报*, 2019, **55**(10): 1 481-1 488.

GUAN F, ZHANG J Y, SHI B, *et al.* Resistance identification to fusarium wilt and difference in physiological response under stress of *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* in bitter melon[J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, **55**(10): 1 481-1 488.

[26] GIMENEZ E, SALINAS M, MANZANO-AGUGLIARO F. Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture[J]. *Sustainability*, 2018, **10**(2): 391.

[27] PASTUSZAK J, SZCZERBA A, DZIURKA M, *et al.* Physiological and biochemical response to *Fusarium culmorum* infection in three durum wheat genotypes at seedling and full anthesis stage[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(14): 7 433.

[28] BOUDET A M. Evolution and current status of research in phenolic compounds[J]. *Phytochemistry*, 2007, **68**(22-24): 2 722-2 735.

[29] 王生荣, 朱克恭. 植物系统获得抗病性研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2002, **10**(2): 32-35.

WANG S R, ZHU K G. Advances of research on systemic acquired resistance in plant[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2002, **10**(2): 32-35.

[30] 常君, 姚小华, 张亚波, 等. 松针刺盘孢菌侵染对薄壳山核桃不同抗性品种酶活性和酚类物质的影响[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2022, **44**(3): 52-58.

CHANG J, YAO X H, ZHANG Y B, *et al.* Effects of *Colletotrichum fioriniae* infection on enzyme activity and phenolics content of different resistant varieties of pecan[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2022, **44**(3): 52-58.

[31] 郭艳玲, 张鹏英, 郭默然, 等. 次生代谢产物与植物抗病防御反应[J]. *植物生理学报*, 2012, **48**(5): 429-434.

GUO Y L, ZHANG P Y, GUO M R, *et al.* Secondary metabolites and plant defence against pathogenic disease[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, **48**(5): 429-434.

[32] 王馨雨, 杨绿竹, 王婷, 等. 植物多酚氧化酶的生理功能、分离纯化及酶促褐变控制的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, **41**(9): 222-237.

WANG X Y, YANG L Z, WANG T, *et al.* Recent progress toward understanding the physiological function, purification, and enzymatic browning control of plant polyphenol oxidases[J]. *Food Science*, 2020, **41**(9): 222-237.

[33] 晋坤贞, 蔡素雯, 薛毓华, 等. 植物抗病力与多酚氧化酶的关系[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 1989, **19**(2): 77-80.

JIN K Z, CAI S W, XUE Y H, *et al.* Relations between multiphenol oxidase of tomatoes and its disease resistance after being managed by magnetic water[J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 1989, **19**(2): 77-80.

[34] DEBONA D, RODRIGUES F Á, RIOS J A, *et al.* Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Piricularia oryzae*[J]. *Phytopathology*, 2012, **102**(12): 1 121-1 129.

[35] 尹梦莹, 杜光辉, 龚亚菊, 等. 喀西茄在黄萎病菌胁迫下的生理生化防卫反应[J]. *西南农业学报*, 2020, **33**(4): 781-787.

YIN M Y, DU G H, GONG Y J, *et al.* Physiological and biochemical defense response of *Solanum khasianum* under stress of *Verticillium* wilt[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2020, **33**(4): 781-787.

[36] 吴玲利, 李建安, 王楠, 等. 低温胁迫对两个油茶品种开花结实及生理特性的影响[J]. *植物生理学报*, 2020, **56**(4): 681-692.

WU L L, LI J N, WANG N, *et al.* The effects of low temperature stress on the flowering, fruiting and physiological characteristics of two *Camellia oleifera* cultivars[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, **56**(4): 681-692.

[37] 代颖, 杨雅馨, 廖鑫, 等. 尖孢镰孢菌侵染后大豆的生理生化指标检测[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2021, **43**(1): 81-86.

DAI Y, YANG Y X, LIAO X, *et al.* Study on physiological and biochemical responses of soybean infected by *Fusarium oxysporum*[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2021, **43**(1): 81-86.

[38] 徐嘉美, 郭静怡, 吴杨, 等. AM真菌对留兰香和常夏石竹耐盐性的影响[J]. *西北植物学报*, 2021, **41**(12): 2 104-2 112.

XU J M, GUO J Y, WU Y, *et al.* Effect of AM fungi on the salt tolerance of *Mentha spicata* and *Dianthus plumarius*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(12): 2 104-2 112.

(编辑:裴阿卫)