南方根结线虫不同接种密度对灯盏花抗氧化系统的影响

林丽飞[1,2]， 张 敏[1]， 和 平[1]， 罗巧育[1]， 胡先奇[1*]

(1. 云南农业大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室，昆明 650201；
2. 云南省农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室，云南红河学院，蒙自 661100)

摘要 通过室内接种方法，测定了南方根结线虫2龄幼虫在不同接种时间(25、35 d)和不同接种密度(0、500、700、1 000、1 200、1 500头/株)下对灯盏花生长和根系及叶片丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶活性(POD)及过氧化氢酶活性(CAT)的影响。研究结果表明，南方根结线虫接种密度为1 000头/株时，接种后25 d与35 d的根结指数达到最大，分别为87.2及65.6；接种密度500头/株，对根结指数影响较大。接种后25 d，接种量对灯盏花病根与病叶的过氧化物酶活性影响不大；接种后35 d，灯盏花病根的过氧化物酶活性(POD)随接种密度的增加先降低后升高，病叶中的POD活性除了接种密度为1 000头/株时低于健康叶部外，其他均高于健康组；接种密度对灯盏花的过氧化氢酶(CAT)活性影响较大，在1 000头/株时，病根和病叶中的过氧化氢酶活性都明显高于对照。接种密度对于灯盏花叶片的丙二醛(MDA)含量影响不大，当密度为1 000头/株接种35 d对根部丙二醛的影响最大，其含量明显高于对照；接种密度对于灯盏花病叶和病根中的超氧化物歧化酶(SOD)活性影响较大，病叶中的超氧化物歧化酶(SOD)普遍高于健康组，而病根中的SOD活性普遍低于健康组。综合研究结果，当南方根结线虫接种密度为500头/株时，对灯盏花有一定危害，随着接种密度的增加，危害逐渐加重，当接种密度为1 000头/株时，根结指数最大，几种酶活性都显著高于健康植株，接种密度大于1 000头/株时，酶活性逐渐下降。接种初期，南方根结线虫对灯盏花叶部危害较大，随着种植时间的推移，对根部危害逐渐加重。

关键词 南方根结线虫； 灯盏花； 接种量； 过氧化物酶； 过氧化氢酶； 丙二醛

中图分类号： S 435.67 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2017130

Effects of different inoculation densities of *Meloidogyne incognita* on the antioxidant system of *Erigeron breviscapus*

LIN Lifei[1,2]， ZHANG Min[1]， HE Ping[1]， LUO Qiaoyu[1]， HU Xianqi[1]

(1. *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources*, *Yunnan Agricultural University*, *Kunming* 650201, *China*; 2. *Key Laboratory for Crop High-Quality Cultivation and Security Control of Yunnan Province*, *Yunnan Honghe University*, *Mengzi* 661100, *China*)

Abstract The growth and development of *Erigeron breviscapus* were studied in different time points (25/35 d) and different inoculation densities (0, 500, 700, 1 000, 1 200, 1 500 individual/plant) and malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities in roots and leaves were studied. The results showed that the root knot indexes reached the maximum which were 87.2 and 65.6 at 25 and 35 d post-inoculation, respectively, when the inoculation density was 1 000 individual/plant, and the root knot index was influenced when the inoculation density was 500 individual/plant. Inoculation amount had no effect on POD activity of *E. breviscapus* at 25 d, which decreased first and then increased at 35 d after inoculation, and the POD activity was generally higher in the diseased leaves than that in the healthy group except at the inoculation density of 1 000 individual/plant. The inoculation density had a great effect on CAT activity in *E. breviscapus*. The CAT activity in roots and

收稿日期： 2017-04-07 **修订日期**： 2017-05-10
基金项目： 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20135302110003)；国家自然科学基金(61068003)；云南省应用基础研究项目(2009ZC131M)；第一批红河学院中青年学术带头人后备人才项目(2010PY0104)
* 通信作者 E-mail：xqhoo@126.com

diseased leaves was significantly higher than that in the control at 1 000 individual/plant. The inoculation density had little effect on the content of MDA in the leaves. When the density was 1 000 individual/plant for 35 days, the effect on MDA content in roots was the highest, which was significantly higher than that of the control. Inoculation density had stronger effects on the SOD activity in the diseased leaves than in the root; the SOD activity was generally higher in the diseased leaves than that in healthy group, and the SOD activity in the diseased roots was generally lower than that in the healthy group. The results showed that the root knot index was the highest when the inoculation density was 1 000 individual/plant. When the inoculation density was greater than 1 000 individual/plant, the enzyme activity decreased gradually. In the early stage of inoculation, the root-knot nematodes were more harmful to the leaves of the light bulb, and the root hazard gradually increased with the planting time.

Key words *Meloidogyne incognita*; *Erigeron breviscapus*; inoculation density; peroxidase; catalase; malonaldehyde

灯盏花 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 是菊科飞蓬属多年生植物[1],因其药效独特、毒副作用小等优点而受到重视。云南是灯盏花的主要产区,产量占全国 95%以上[2]。近年,云南省已很难见到成片的灯盏花,植株分布频度已接近稀少或枯竭,且在灯盏花大规模种植栽培中,受到了许多病害,如根腐病[3]、锈病[4]、黄萎病[5]、线虫病[6]的危害。而灯盏花种植设施的改进,复种指数的上升,种植面积的扩大,为根结线虫创造了更为有利的生存环境,使根结线虫病的发生和危害日趋严重。根结线虫的危害使植株生长缓慢、矮小,品质下降,产量降低,给灯盏花生产造成严重损失[7],同时对灯盏花繁殖速率也有很大影响。Seinhorst[8] 研究表明,根结线虫的初始接种密度和最终密度的常用对数值有显著线性关系。2016 年笔者在云南农业大学研究了温室条件下南方根结线虫在不同时间及不同接种密度条件下引起的灯盏花症状表现及几种酶活性的情况,以便于估计线虫密度对灯盏花的影响程度,为灯盏花线虫病的损失估计和安全预警提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试根结线虫

供试南方根结线虫由本实验室分离纯化,保存于番茄根部。试验前采集番茄根结,用水清洗干净,剪成大约 1 cm 的小段,用 1%的次氯酸钠浸泡,并用玻棒轻轻敲打大约 5 min,用浅盘收集卵粒,并将卵粒置于 28℃的恒温箱中进行培养,数天后收集 2 龄幼虫,并用于接种试验。

1.2　供试灯盏花植株

挑选饱满的灯盏花种子,经 70%乙醇消毒 30 s、5%次氯酸钠消毒 2 min、无菌水清洗 3 次后接种到 MS 培养基上,待植株长至 3～5 cm 时,移栽到灭菌基质中培养约 20 d 用于接种根结线虫。根结线虫接种密度分为 6 个处理,即每株接种 0(CK)、500、700、1 000、1 200、1 500 头 2 龄幼虫,接种后 25、35 d 每处理随机取 5 株进行观察测定。

1.3　抗性指标的测定

取温室中接种南方根结线虫 25 d 和 35 d 的灯盏花植株的根部及叶片,清洗干净,计数根结数,计算根结指数[9-10]。测定以下抗性指标:过氧化物酶(peroxidase,POD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)活性,丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性[11-12]。

0 级:无根结或卵块形成;1 级:有少数根结,根系上有 1～2 个根结;2 级:大部分根上有根结,根系上有 3～30 个根结;3 级:根系上有 31～100 个根结;4 级:根结相互连接成为团块,根结数大于 100。根结指数=Σ(相应级别的植株数×病级数值)/(调查总株数×最高病级)×100。

2　结果与分析

2.1　不同接种密度对灯盏花根结指数的影响

接种南方根结线虫后,灯盏花表现的病害症状随接种密度的增加而逐渐加重,接种 25 d 和 35 d 的灯盏花根结指数都随着接种密度的增加先升高后降低,在接种密度为 1 000 头/株时根结指数达到最大值(图 1)。

2.2　不同接种密度对灯盏花过氧化物酶(POD)活性的影响

接种 25 d 后,不同接种密度对灯盏花的过氧化物酶活性影响不大,对照组和处理组数值变化不大。接种 35 d 时,在接种密度为 1 000 头/株时,灯盏花叶片的过氧化物酶活性最低,为 49.5 U·g/min。之后随着接种密度的增加其活性又逐渐增加;灯盏

花根部过氧化物酶活性随接种密度的增加先下降后上升，接种密度为 1 200 头/株时，灯盏花根部的 POD 最低为 41.5 U·g/min，当接种密度为 1 500 头/株时，根部和叶片的 POD 均达到最大值，分别是对照的 1.2 倍和 2.4 倍(图 2)。

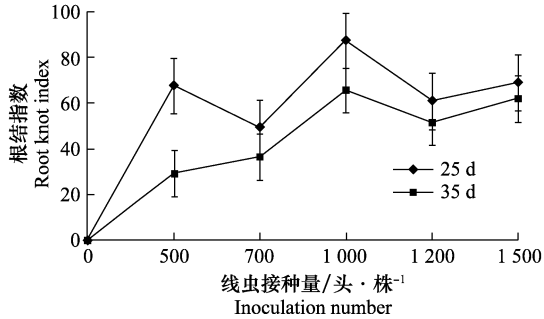
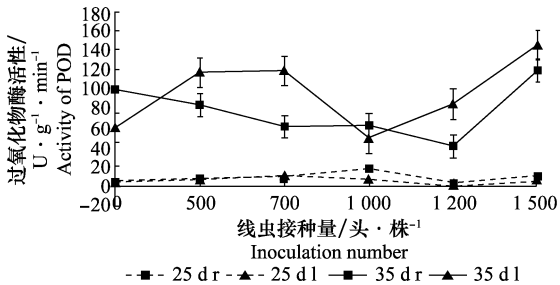


图 1 不同接种初始密度对灯盏花根结指数的影响

Fig. 1 Effects of different initial inoculation densities on the root knot index of *Erigeron breviscapus*



图中r表示根部，l表示叶部，d表示天数。下图同
r indicates root, l indicates leaf, d indicates days after inoculation. The same blow

图 2 不同接种初始密度对灯盏花 POD 的影响

Fig. 2 Effects of different initial inoculation densities on POD of *Erigeron breviscapus*

2.3 不同接种密度对过氧化氢酶(CAT)活性的影响

由图 3 可知，灯盏花叶片的 CAT 活性在接种线虫 25 d 后与对照相比差异不大。在 35 d 时，过氧化氢酶活性与对照相比随接种密度的增加先下降而后略上升，在最高接种密度 1 500 头时，与对照相比变化不大。侵染根结线虫后对根部的 CAT 影响较大，接种 25 d 时，先下降后上升又下降，在接种密度为 1 000 头/株时达到最大，是对照的 1.18 倍；接种 35 d时，接种 1 000 头/株和 1 200 头/株处理 CAT 活性明显上升，是对照的 3.875 倍。

2.4 不同接种密度对丙二醛(MDA)含量的影响

从图 4 可以看出，在接种 25 d 时，不同接种密度下根部的丙二醛含量变化不大，而叶片中丙二醛含量在 700 头/株时最低，之后随密度增加而逐渐上升；接种 35 d 时，接种密度为 1 000 头/株时，灯盏花根部的丙二醛含量比对照高，为对照的 1.87 倍，而叶部的丙二醛含量各处理与对照相差不大，说明根结线虫侵染可能不会导致植株叶部的膜脂过氧化。

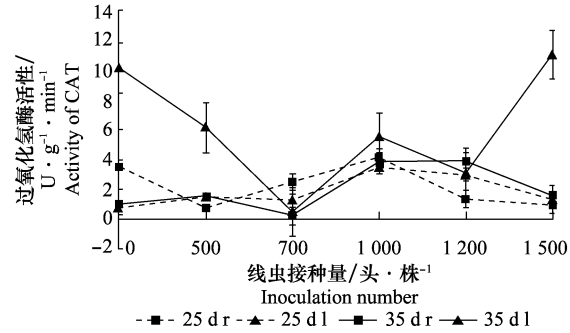


图 3 不同接种初始密度对灯盏花 CAT 的影响

Fig. 3 Effects of different initial inoculation densities on CAT of *Erigeron breviscapus*

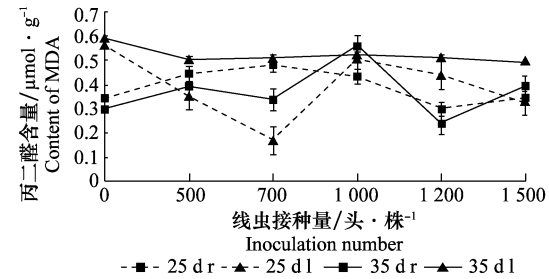


图 4 不同接种初始密度对灯盏花 MDA 的影响

Fig. 4 Effects of different initial inoculum densities on MDA of *Erigeron breviscapus*

2.5 不同接种密度对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

从图 5 可以看出，根结线虫侵染 35 d 后，接种密度对灯盏花根部和叶片的 SOD 活性影响较大，随着接种密度增加，根部的 SOD 活性均低于对照组；叶片中的 SOD 与对照相比差异不大，接种密度为 700 头/株和 1 000 头/株时，SOD 活性比对照分别提高了 1.84 倍和 1.41 倍，而接种密度为 1 200 头和 1 500 头处理与对照相比 SOD 活性显著减低了 4 倍和 2.22 倍。接种 25 d 根部的 SOD 在接种密度为 1 500 头/株时，比对照高出 5.5 倍，其他接种密度与对照差异不大，叶片中的 SOD 在接种密度为 500 头/株和 1 000 头/株时，与对照相比分别增加了 4.4 倍和 3.62 倍。

3 结论与讨论

根结线虫侵染能够刺激植株根系形成根结，直接破坏根细胞正常结构，使根系活力下降，影响根系

矿质营养和水分正常运输,从而抑制植株地上部生长[13]。灯盏花幼苗遭受根结线虫侵染后,随着侵染线虫密度的增加,根结指数先增加后降低,当接种密度为 1 000 头/株时,根结指数达到最大,这与黄华娟等[14-15]的报道相一致。说明高的接种密度限制了线虫的营养供应。

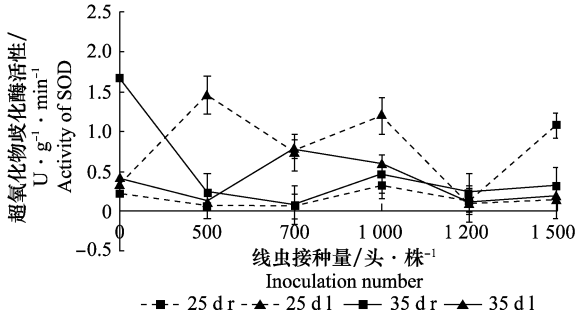


图 5　不同接种初始密度对灯盏花 SOD 的影响

Fig. 5　Effects of different initial inoculum densities on SOD of *Erigeron breviscapus*

线虫初始密度与作物产量关系密切,当线虫初始密度大于经济阈值时,将会导致作物产量损失[16],所以了解根结线虫影响寄主生长的最低初始密度对确定根结线虫防治的虫口密度具有重要意义。本研究结果表明:接种密度为 1 000 头时,灯盏花的根结指数达到最大值。通过探索不同接种密度对灯盏花几种抗性酶活性的影响,可以为遭受根结线虫危害地区的灯盏花生产提供一定的指导。

根结线虫侵染对灯盏花幼苗生长产生严重抑制,同时,线虫侵染还可引起植株内部发生一系列生理生化变化。在长期进化过程中,植物体为免受活性氧伤害而形成了相应的抗氧化保护酶系统,主要包括 SOD、CAT 和 POD,只有三者协调一致,才能使活性氧维持在较低水平以防止细胞受损[17]。MDA 是一种强烈地与细胞内其他成分发生氧化反应的物质,因而易引起对酶和膜的严重损伤,导致膜结构完整性及生理功能的破坏,是反映膜质过氧化程度的重要指标,含量越高,膜脂过氧化越严重,植物受到的胁迫越严重。在根结线虫侵染灯盏花过程中,对于根部影响较大,接种密度为 1 000 头/株时,对于细胞膜的损伤最大。植物叶片中的 CAT 主要是清除光呼吸产生的 H_2O_2,本研究中的过氧化氢酶活性在接种密度为 1 000 头/株时,除了 35 d 的病叶外,其他处理组的病根和病叶的过氧化氢酶活性都比对照略高。接种 25 d 时病根中的 SOD 活性与对照差异不大,病叶中的 SOD 活性在接种量为 500、1 000、1 500 头/株时,高于健康的叶片;接种后 35 d,病根中的 SOD 活性低于健康组,病叶中除了 700 头/株及1 000 头/株处理的 SOD 活性高于健康组之外,其他处理组与健康叶片相差不大。本研究与前人试验结果相比较,如根结线虫对黄瓜、茄子、豇豆等[18-21]的影响,总体的变化趋势是一致的。叶德友等[18]研究发现,黄瓜被南方根结线虫侵染后,抗病品种的 SOD 活性降低,感病材料的 SOD 活性升高,抗病与感病材料中的 POD 活性均有所升高;王冰林等[19]研究表明,茄子受南方根结线虫侵染后,SOD 活性、POD 活性和 CAT 活性总体上均呈先升后降的趋势,MDA 含量持续增加;张丹丹[20]的研究也表明在线虫的接虫量范围内,病根和病叶中的 MDA 活力呈上升趋势,且明显高于健康根和叶,表明随着线虫侵染进程增加,细胞膜损伤逐渐加大。

本试验结果表明,接种 25 d 时,接种密度对灯盏花叶片各种抗性酶活性影响较大,接种 35 d 时对灯盏花根部影响较大。根结线虫侵染后,处理组与对照组存在的差异可能是植物体遭受胁迫后对细胞内活性氧清除系统进行的自我调节,使保护酶系统的不同成员之间相互协调、相互配合,叶部和根部的不同变化趋势有可能是不同组织的抗性机制不同所致。

参考文献

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第 4 册)[M]. 北京:科学出版社,1985:444.

[2] 李莎,李继红. 云药崛起彩云之南[EB/OL]. (2014-04-25) http://finance.China.com.cn/roll/20140425/2363790.shtml.

[3] 赖宝春,胡先奇,罗文富. 云南灯盏花根腐病的 2 种新病原鉴定及防治药剂的室内筛选[J]. 植物保护,2014,40(2):141-145.

[4] 林丽飞,胡先奇,江楠. 短荸飞蓬锈病的初步研究[J]. 华中农业大学学报,2004,23(5):513-514.

[5] 林丽飞,刘春国,胡先奇,等. 云南省灯盏花黄萎病病原初步研究[J]. 植物保护,2007,33(4):89-91.

[6] 林丽飞,胡先奇,刘春国,等. 云南省灯盏花根际土壤寄生线虫的种类鉴定[J]. 植物保护,2008,34(3):69-73.

[7] 胡先奇,鲁菊芬,林丽飞,等. 云南发现灯盏花根结线虫病[J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):317-319.

[8] SEINHORST J W. The relation between nematode density and damage to plants [J]. Nematology,1965,11:137-154.

[9] 鄢小宁,林茂松,刘亮山. 南方根结线虫拮抗链霉菌的筛选和鉴定[J]. 中国生物防治,2004,20(3):202-205.

[10] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版

社，1998.
[11] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京：中国农业出版社，1995：30－32.
[12] 胡玮. 钾对番茄部分抗性生理指标的影响及其对根结线虫的防治效果[D]. 北京：中国农业科学院，2010.
[13] 宾淑英，冯志新. 花生根结线虫对花生的致病性研究[J]. 防护林科技，1993(1)：7－13.
[14] 黄娟华，卓侃，林柏荣，等. 温度和初始种群密度对象耳豆根结线虫侵染番茄的影响[J]. 植物保护，2013，39(5)：177－180.
[15] 张锋，李英梅，洪波，等. 温度和初始接种量对南方根结线虫侵染力的影响[J]. 中国生态农业学报，2012，20(12)：1631－1635.
[16] MISHRA N P，MISHRA R K，SINGHAL G S. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperature in the presence of protein synthesis inhibitors [J]. Plant Physiology，1993，102(3)：903－908.
[17] HOU E，STARR J L. A comparison of the damage functions，root galling，and reproduction of *Meloidogyne inconita* on resistant and susceptible cotton cultivars[J]. Journal of Cotton Science，2003，7(4)：224－230.
[18] 叶德友，钱春桃，贾媛媛，等. 黄瓜及其近缘种对南方根结线虫的抗性及酶响应变化的研究[J]. 园艺学报，2009，36(12)：1755－1760.
[19] 王冰林，韩太利，李媛媛. 根结线虫侵染对茄子苗期生理生化反应的影响[J]. 北方园艺，2012(23)：139－142.
[20] 张丹丹. 油菜素内酯提高黄瓜对根结线虫抗性的机制研究及田间效应[D]. 杭州：浙江大学，2012.
[21] 李青青，漆永红，曹素芳，等. 南方根结线虫侵染对豇豆叶部和根系部分生理生化指标的影响[J]. 西北农业学报，2014，23(2)：49－54.

（责任编辑：田 喆）

（上接 94 页）

[17] BARDIN M，NICOT P C，NORMAND P，et al. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*，causal agent of powdery mildew cucurbits [J]. European Journal of Plant Pathology，1997，103：545－554.
[18] MCGRATH M T，STANISZEWSK H，SHISHKOFF N. Fungicide sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* populations in the united states [J]. Plant Disease，1996，80：697－703.
[19] 严红，李兴红，张涛涛，等. 北京地区瓜类白粉病菌对三唑酮和多菌灵的抗药性监测[M]//中国植物病害化学防治研究，第三卷. 北京：中国农业科技出版社，2002.
[20] BALLANTYNE B. Powdery mildew on Cucurbitaceae：Identity，distribution，host range and sources of resistance [J]. Proceedings of Linnean Society of New South Wales，1975，99(2)：100－120.
[21] COLLINS P，BROWN J K M. Resistance and cross resistance of *Erysiphe graminis* to triazole and morpholine fungicides [C]// The First International Powdery Mildew Conference. Avignon，France，1994：41.

（责任编辑：田 喆）

（上接 104 页）

参考文献

[1] 全林发，张怀江，孙丽娜，等. 杀虫剂对害虫的亚致死效应研究进展[J]. 农学学报，2016，6(5)：33－38.
[2] 范仁俊. 北方果树食心虫发生规律与控制[M]. 北京：中国农业出版社，2015：187.
[3] 马爱红，李文林，路子云，等. 桃树梨小食心虫发生危害及综合防治[J]. 河北农业科学，2016，20(4)：27－29.
[4] 蔡明飞，沈健，仵均祥. 不同杀虫剂对梨小食心虫卵和成虫的室内防效[J]. 果树学报，2010，27(4)：636－640.
[5] 陈静，张建萍，单长林. 蟠桃园梨小食心虫药剂筛选试验[J]. 陕西农业科学，2010(6)：61－63.
[6] 田忠正，丁茜，仵均祥. 10 种杀虫剂对梨小食心虫 *Grapholita molesta* (Busck)卵的室内触杀效果[J]. 西北农业学报，2015，24(9)：140－144.
[7] 张勇，李爱华，单公华，等. 氯虫苯甲酰胺防治枣树桃小食心虫研究[J]. 山西农业科学，2010，38(5)：55－56.
[8] 张坤朋，王相宏，李建华，等. 不同剂量药剂防治山楂梨小食心虫的综合效益评价[J]. 河南农业科学，2016，45(8)：86－90.
[9] 张怀江，仇贵生，闫文涛，等. 氯虫苯甲酰胺对苹果树主要害虫的控制作用及天敌的影响[J]. 环境昆虫学报，2011，33(4)：493－501.
[10] 王芳，庾琴，郭贵明，等. 梨小食心虫幼虫龄数和龄期的划分[J]. 应用昆虫学报，2016，53(2)：390－395.
[11] 徐小龙，徐的进，徐广春. 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾的亚致死不同致死效应[J]. 江苏农业科学，2010(1)：139－140.
[12] 欧善生，梁沛，宋敦伦，等. 氯虫苯甲酰胺亚致死剂量对棉铃虫生长发育和解毒酶活性的影响[J]. 植物保护，2012，38(4)：1－8.
[13] 张琴，王少丽，杨愿愿，等. 氯虫苯甲酰胺对甜菜夜蛾敏感基线的测定和幼虫体重的影响[J]. 长江蔬菜，2010(18)：87－89.
[14] 韩文素，张树发，沈福英，等. 高效氯氰菊酯对小菜蛾阿维菌素抗性、敏感种群的亚致死效应[J]. 环境昆虫学报，2011，33(3)：335－341.
[15] 徐广春. 五种常用杀虫剂对灰飞虱种群的影响[D]. 扬州：扬州大学，2008.
[16] 王晓容，田世尧，杨森辉，等. 人工饲料饲养的甜菜夜蛾发育、蛹重、产卵与存活[J]. 华中农业大学学报，1998，17(5)：447－451.
[17] 庾琴，王芳，张润祥，等. 梨小食心虫蛹重对成虫繁殖力和寿命及下一代幼虫发育的影响[J]. 昆虫学报，2016，59(9)：985－990.
[18] 张振飞，黄炳超，张扬，等. 几种农药对三化螟室内与田间防治效果研究[J]. 现代农药，2011，10(1)：51－57.

（责任编辑：田 喆）