

大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究^{*}

刘亚光¹ 李海英² 杨庆凯¹

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江大学生物工程系, 哈尔滨 150086)

摘要 在抗病品种东农 9674、东农 1572 和感病品种黑农 39、东农 95—165 上接种大豆灰斑病菌的 1 号、2 号、4 号、6 号、7 号等 5 个生理小种, 测定从接种到显症前与抗性有关的苯丙氨酸解氨酶活性的变化。研究结果表明, 抗病的大豆品种接种不同生理小种的灰斑病菌后, PAL 的活性分别从第 6~7 天起呈上升趋势且明显高于对照; 相反感病品种从 8~9 天起 PAL 活性明显低于对照。因此说明 PAL 的活性与大豆抗灰斑病性呈正相关关系。

关键词 苯丙氨酸解氨酶(PAL); 大豆灰斑病; 抗病性

中图分类号 S436.412.13 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2002)03—0195—04

0 前言

近年来, 许多学者对大豆抗灰斑病菌的抗性机制进行了研究, 发现抗病品种叶片的气孔密度较小、叶表面蜡质层较厚、叶片的栅栏组织排列的整齐, 这些都是抗病品种抵抗病原菌侵入和扩展的结构屏障; 在生理生化方面, 大豆在感染灰斑病菌后, 体内过氧化物酶(POD)和超氧化物酶(SOD)都有所增加; 感病品种 POD 与 SOD 的活性明显高于抗病品种。感病品种的游离氨基酸、可溶性糖也均高于抗病品种。目前, 对大豆抗灰斑病的生理生化机制了解的还不够深入, 不能全面揭示其抗病机制, 因此有必要对其进行深入的研究。

植物苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物次生代谢的关键酶之一。它催化 L-苯丙氨酸形成反式肉桂酸这一不可逆过程, 是植物次生代谢产物特别是植物保卫素和木质素合成途径中的限速酶。Behr(1949)等认为细胞的木质化是寄主植物对病原菌侵染的积极反应, 是阻止病原菌进一步侵入的机械屏障。这说明 PAL 酶的活性增强, 则木质素产生加速, 进一步导致植物抗病性的增强。Minamiaki(1964)等发现了植物感染病菌后 PAL 酶活性明显提高^[3], 这在

玉米与小斑病菌^[4]、黄瓜与霜霉病菌^[5]、和水稻与白叶枯病菌^[6]的互作体系中都得到了研究证实, 说明 PAL 酶与植物抗病性密切相关。但有关大豆植株感染灰斑病菌后 PAL 酶活性变化与抗病性关系还未见报道。本文用抗性不同的大豆品种感染致病力不同的灰斑病菌生理小种后, 对叶片内 PAL 酶活性的变化进行了初步的比较研究, 旨在明确大豆植株体内 PAL 酶的变化与其抗病性的内在联系, 为进一步全面揭示大豆灰斑病生理生化抗性机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及接种处理

1.1.1 供试材料: 抗灰斑病的品种: 东农 9674 和东农 1572; 感灰斑病的品种: 黑农 39 和东农 95—165。以上品种均由东北农业大学大豆研究所提供。

1.1.2 供试菌种: 大豆灰斑病菌 1 号、2 号、4 号、6 号和 7 号生理小种均由东北农业大学大豆研究所提供。

1.1.3 材料准备及接种处理: 采用盆栽大豆苗(保证每盆 4 株苗), 在大豆第四片复叶完全展开时进行接种处理, 将刚刚配制好的浓度均为 1.5×10^4 个/

* 收稿日期: 2001—12—19

作者简介: 刘亚光(1968—), 女, 硕士, 讲师, 在职博士研究生。

ml(溶剂3%的蔗糖溶液)不同生理小种的孢子悬浮液,用喷雾器分别以相同的喷液量均匀地喷洒在大豆叶片上。对照组以同样的方法喷洒3%蔗糖溶液,然后用塑料膜将各处理保湿48小时。

1.1.4 取样方法:于接种后的第1~9天连续取样,每次分别取对照组和处理组各供试品种的相同叶位的叶片(第三片复叶)8~10片,然后将叶片立即放入冰盒中,保存在-20℃冰柜中备用。

1.2 PAL酶液的提取和PAL酶活性的测定方法

分别取各处理叶片1.0g,放入预冷的研钵中,加入5ml 0.1M pH8.8 硼酸缓冲液(内含5mmol/L 巯基乙醇、1mmol/L EDTA 以及5%甘油(v/v))和0.1g PVP 及少量的石英砂,在冰浴中研磨成匀浆,然后于10 000 rpm、4℃离心15min,上清液即为粗

酶液。

在5ml反应体系中,含80vI酶液,3.92ml PAL样品提取液和1ml 0.02M L-苯丙氨酸。测定时的对照不加酶液而用80vI PAL样品提取液代替。反应体系于40℃水浴中保温60min后,立即加入0.2ml 6N HCl终止反应,随后测定OD₂₉₀值,以OD值变化0.01为一个酶活性单位,用 units. g⁻¹FWmin⁻¹表示酶活力^[8-12]。

2 结果与分析

抗性不同的大豆品种感染致病力不同的灰斑病菌生理小种后,大豆叶片内苯丙氨酸解氨酶活性的动态变化如下所述。

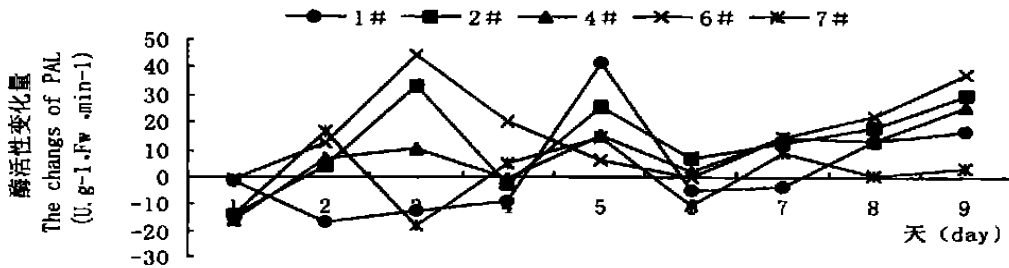


图1 东农9674感染不同生理小种的灰斑病菌后叶片内PAL酶活性的动态变化

Fig. 1 The changes of pal in leaves of DN-9674 inoculated by different races of *C. sojae* at various time

从图1—图3可以看出,接种后第1天,PAL酶活性低于对照,这是由于植物体内有一定的PAL酶,当灰斑病菌侵入时,PAL酶诱导植物产生次生代谢产物对灰斑病菌产生抵抗力,而次生代谢产物的产生消耗了一部分PAL酶,同时又激活和产生了一些PAL酶,但这时消耗的PAL酶多于激活和产生的PAL酶,所以PAL酶活性下降;接种后第2—3天,PAL酶活性均开始增加,分别在第3天、第5—7天和第9天左右产生三次峰值。病原菌侵入后第3天左右产生了一次峰值,这一峰值是由于第1天

PAL酶活性下降,使植株体内PAL酶失去平衡,所以在第2—3天激活和产生了大量的PAL酶,使PAL酶活性增加到一个峰值。该峰值过后,植株体内的PAL酶足以调节次生代谢产物的产生,这时PAL酶的活性下降,PAL酶继续被消耗,从而再一次地诱导了PAL酶的激活和产生。在第6天左右又产生一次峰值,此次峰值除东农95-165比对照低,其余均高于对照。由于东农95-165本身的PAL酶活性较高,病原菌对它的刺激较小,所以产生激活的PAL酶少,其酶活性比对照小。

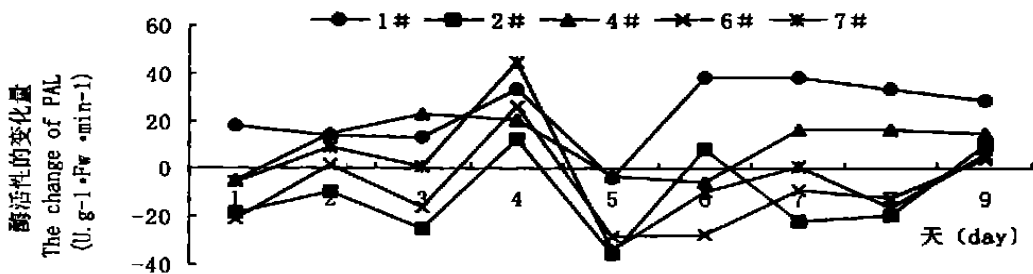


图2 东农1572感染不同生理小种的灰斑病菌后叶片内PAL酶活性的动态变化

Fig. 2 The changes of PAL in leaves of DN-1572 inoculated by different races of *C. sojae* at various time

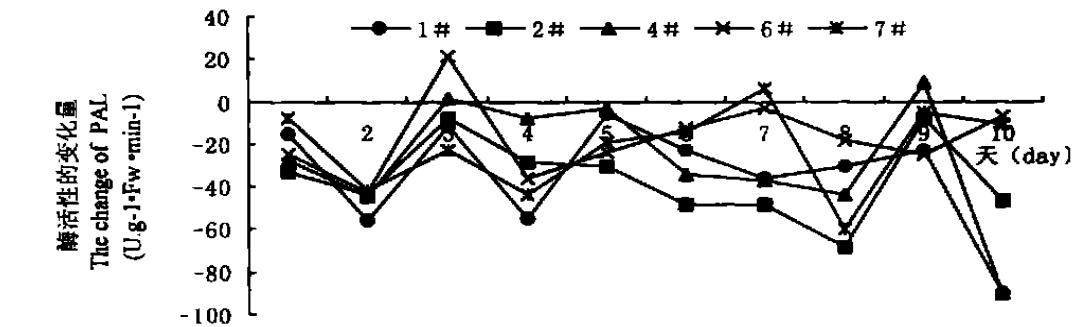


图 3 东农 95-165 感染不同生理小种灰斑病菌后叶片内 PAL 酶活性的动态变化

Fig 3 The changes of PAL in leaves of DN-95-165 inoculated by different races of *C. sojae* at various time

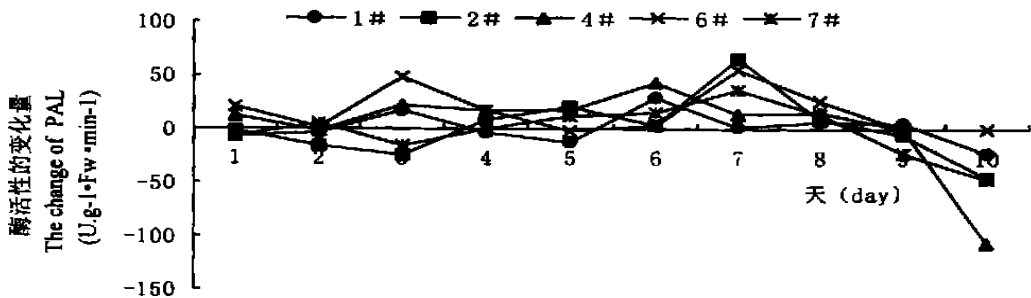


图 4 黑农 39 感染灰斑病菌生理小种后叶片内 PAL 酶活性的动态变化

Fig 4 The changes of PAL in leaves of HN-39 inoculated by different races of *C. sojae* at various time

在接种后第 9 天时, 除黑农 39 外其它品种均出现第三次峰值, 黑农 39 自第二次峰值(第 6~7 天)后一直呈现下降的趋势。不同生理小种的灰斑病菌接种抗性不同的品种, 第 9 天 PAL 酶活性的变化如

图 5-8 所示: 抗病品种东农 9674 和东农 1572 的 PAL 酶活性都比对照高, 而感病品种黑农 39 和东农 95-165 的 PAL 酶活性都低于对照。

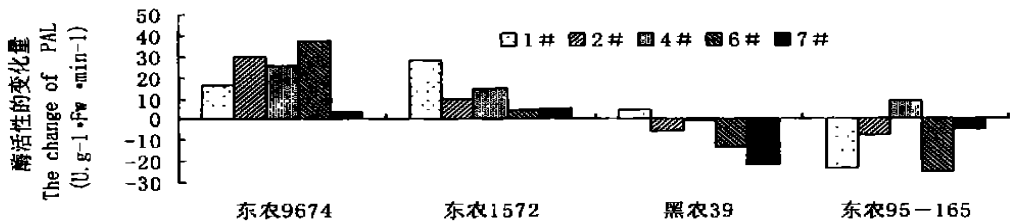


图 5 抗性不同的品种感染灰斑病菌第 9 天后 PAL 酶活性的变化量

Fig. 5 The changes of PAL in leaves of different resistant varieties inoculated by different races of *C. sojae* at ninth day

抗病品种东农 9674 和东农 1572 接种不同生理小种后分别从第 6 天和第 8 天起 PAL 酶活性呈上升趋势且明显高于对照; 相反感病品种接种不同生理小种 8~9 天起 PAL 酶活性明显低于对照, 其中黑农 39 从第 7 天起呈持续下降趋势, 而东农 95-165 的 PAL 酶活性于接种后均低于对照。以上这些结果均表明 PAL 酶与大豆品种的抗病性呈明显的正相关关系。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢途径即酚类物质、植保素、黄酮和木质素等抗菌物质合成过程中关键酶和限速酶, 所以 PAL 被认为是植物的防御酶之一, 其活性的最强, 对植物的抗病性是十分有利的。近年来有许多学者对植株感染病菌后 PAL 活性的变化进行了研究, 并得出了 PAL 酶与植物抗病性密切相关。植物对病原物入侵的生理反应是以酶的催化活动而实现的。一般来说, 植物受到病原菌侵染后, PAL 活性升高, 抗病品种受到病原菌诱导所产生的 PAL 活性远比感病品种高, PAL 活性与品种抗病性成正较高的正相关性这在水稻与稻瘟病菌

3 讨论

(张江涛等, 1987)、玉米与小斑病菌(秦泰辰等, 1991)、黄瓜与霜霉病菌(李靖, 1991)和水稻与白叶枯病菌(吴岳轩等, 1996; 孔凡明等, 1998)的互作体系研究中得到了证实。然而, 据王敬文、薛应龙(1982)报道: 玉米小斑病菌 T 小种使感病品种 PAL 活性大幅度提高, 对抗病品种作用甚小, 表现出 PAL 活性的增高与玉米抗病性呈负相关; 以及叶茂炳等(1990)研究认为: 小麦品种在拔节期和孕穗期 PAL 活性的变化与抗病程度呈负相关。

从本实验中发现, 大豆感染灰斑病菌后, 其体内 PAL 酶的活性是一个动态变化过程。无论抗病品种还是感病品种都呈现出三次峰值。这些说明寄主与病原菌之间的作用是相互的, 抗病品种和感病品种在病原菌侵染后都表现出抗病机制; 抗病品种在接种后 9 天内产生了三次峰, 并且这三次峰均为正值而感病品种黑农 39 只有两次峰值, 在第二次峰值后, 一直呈现下降的趋势, 感病品种东农 95—165 的 PAL 活性于接种后均处于低于对照水平。这说明大豆品种对灰斑病的抗感反应也是从第 9 天左右才完全表现出来的, 这与灰斑病菌的潜育期(10 天左右)相吻合。第三次峰值后抗病品种 PAL 酶活性上升很高, 进行次生代谢, 产生植保素、酚类或醌类等次生代谢产物抵抗病原菌, 使病菌不能再破坏叶片的细胞结构, 表现出抗病; 感病品种在第三次峰值后 PAL 酶活性降低了很多, 不足以抵抗病原菌的侵入

和扩展, 从而表现感病症状。这些结果均表明 PAL 活性与大豆品种的抗灰斑病性呈明显的正相关。

参 考 文 献

- 1 张江涛. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)与水稻抗稻瘟病的关系[J]. 植物生理学通讯, 1987, (6): 34—37.
- 2 叶茂炳, 徐朗莱, 徐雍泉, 等. 苯丙氨酸解氨酶和绿原酸与小麦抗赤霉病性的关系[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(3): 103—107.
- 3 孔凡明, 许志刚. 水稻不育系抗白叶枯病与体内酶活性变化的关系[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(3): 217—223.
- 4 秦泰辰. 玉米在小斑病菌 T 小种侵染过程中酶活性变化[C]. 主要农作物抗病性研究进展, 1991, 282—289.
- 5 李靖, 利谷干, 袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 2(4): 277—283.
- 6 吴岳轩, 曾富华, 王容臣. 杂交水稻对白叶枯病的诱导抗病性与细胞内防御酶系统关系的初步研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 127—131.
- 7 孔凡明, 许志刚. 水稻不育系抗白叶枯病与体内酶活性变化的关系[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(3): 217—223.
- 8 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 I [J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 373—380.
- 9 吴岳轩, 曾富华. 杂交稻对白叶枯病的诱导抗病性与细胞内防御酶系统关系的研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 127—131.
- 10 叶茂炳, 徐朗莱, 徐雍泉. 苯丙氨酸解氨酶和绿原酸与小麦抗赤霉病性的关系[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(3): 103—107.
- 11 薛应龙. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定, 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社出版, 1985, P191—192.

STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN RESISTANCE OF SOYBEAN AND ACTIVITY OF PAL IN LEAVES OF SOYBEAN INFECTED BY CERCOSPORA SOJINA HARA

Liu Yaguang¹ Li Haiying² Yang Qingkai¹

(1. Northeast Agriculture University, Agriculture College, Harbin 150030 PRC;

2. Department of Bio—engineering, Heilongjiang University, Harin 150086 PRC)

Abstract Soybeans varieties that included not only resistant DN—9674 and DN—1572 but also susceptible HN—39 and DN95—165, were inoculated with No. 1, No. 2, No. 4, No. 6 and No. 7 races of *Cercospora sojina* Hara as 3th or 4th leaves, leaves were sampled during 1~10 days after inoculating and the PAL activities in leaves of both the inoculated and the healthy plants were measured. The results showed that in the late period of disease development, the PAL activities in leaves of resistant varieties increased and were significantly higher than those in the healthy leaves of control of corresponding soybean varieties, but the PAL activities in leaves of susceptible varieties were obviously lower than those in the healthy leaves of control. Thus the relationship between the PAL activity and the resistance of soybean variety to frog—eye leaf spot was positive correlation.

Key words Phenylalanine Ammonia Lyase(PAL); Frog—eye leaf spot; Resistance