

## 接种疫霉根腐菌对大豆苯丙氨酸解氨酶活性的影响

孙 欣, 刘丽君, 薛永国, 杨 喆

(黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘 要:**大豆疫霉根腐病是一种危害严重的疫霉病害, 对于抗病性的生理生化机制研究很少。苯丙氨酸解氨酶是联系初级代谢和次级代谢的关键酶, 对于植物抗病性具有重要意义。为探讨苯丙氨酸解氨酶活性变化与大豆对疫霉根腐病抗性的关系, 对不同抗、感病大豆品种接种疫霉根腐菌 1 号生理小种前及接种 24、48、72、96 h 后测定叶片中苯丙氨酸解氨酶活性的变化特点进行分析, 探讨苯丙氨酸解氨酶在抗大豆疫霉根腐病中所起的作用。结果表明: 接种大豆疫霉菌 1 号生理小种后, 抗、感病品种叶肉细胞中苯丙氨酸解氨酶活性都呈现出规律性变化趋势, 但在抗、感病大豆品种中峰值变化幅度不同, 表明大豆对疫霉根腐病的抗性与苯丙氨酸解氨酶活性有关。

**关键词:**大豆疫霉根腐病; 苯丙氨酸解氨酶; 酶活性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0641-04

## Changes of L-phenylalanin ammo-nialyase Activity in Soybean inoculated with *Phytophthora sojae*

SUN Xin, LIU Li-jun, XUE Yong-guo, YANG Zhe

(Soybean Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Soybean *Phytophthora* root rot is a serious *Phytophthora* disease. L-phenylalanin ammo-nialyase (PAL) as a key metabolic enzyme that linked the primary and secondary metabolism, is important to disease resistance of plant. To discuss the relationship between PAL activity and *Phytophthora* root rot resistance in soybean. Soybean cultivars resistant or sensitive to *Phytophthora* root rot were inoculated with *Phytophthora sojae* race 1, and the PAL activity before inoculation and 24, 48, 72 and 96 h after inoculation was determined. The result showed that the PAL enzymatic activity changed regularly after being inoculated by *Phytophthora sojae* race 1, while the changing ranges were different in resistant and sensitive soybean cultivars. Therefore, there is some relationship between the PAL activity and the resistance of soybean to *Phytophthora* root rot.

**Key words:** *Phytophthora* Root Rot; L-phenylalanin ammo-nialyase; Enzymatic activity

大豆疫霉根腐病 (*Phytophthora* Root Rot) 是一种危害严重的疫霉病害。由于其土传的特性和极强的生存能力, 该病害迄今在世界大豆主产区仍呈扩大蔓延之势<sup>[1]</sup>。美国等国家在 20 世纪 50 年代就对该病进行了系统的研究, 但主要集中在对生理小种的鉴定、病害的流行、抗性机制、抗原筛选以及病害的防治等方面, 而对于抗病性的生理生化机制研究很少<sup>[2]</sup>, 目前对该病的抗病性与酶活性之间关系的研究报道一直集中于超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶这一类酶上, 对氧化酶、次生代谢酶的研究报道很少<sup>[3-4]</sup>。

植物苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是植物苯丙烷类次

生代谢途径的关键酶和限速酶<sup>[5]</sup>。它是催化 L-苯丙氨酸 (L-Phe) 经由非氧化脱氨反应, 生成反式-肉桂酸 (t-CA) 和氨的关键酶, 是苯丙烷代谢的首步反应, 由此进入苯丙烷代谢途径, 可以生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物, 这些化合物再进一步代谢转化为一类苯丙素类化合物。因而苯丙氨酸解氨酶是联系初级代谢和次级代谢的关键酶, 它能将芳香化合物中的碳转向苯丙烷代谢物的合成<sup>[6]</sup>。因此有学者提出 PAL 可作为植物抗病性的一个生理指标。有研究表明, 马铃薯感染晚疫病后 PAL 活性出现一定规律性的变化<sup>[5]</sup>。目前在 PAL 与大豆抗病性关系的研究中, 刘亚光等<sup>[6]</sup>提出 PAL 的活性与

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”计划资助项目 (2006AA10Z1F9)。

作者简介: 孙欣 (1979-), 女, 硕士, 研究方向为植物学。

通讯作者: 刘丽君, 研究员。E-mail: nkyssbd@126.com。

大豆抗灰斑病性呈正相关。通过对8个抗、感病大豆品种接种大豆疫霉根腐菌1号生理小种后叶片中苯丙氨酸解氨酶活性变化进行研究,探讨苯丙氨酸解氨酶活性变化与大豆对疫霉根腐病抗性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试品种 抗病品种:Darby、Hobbit、Kottman、抗线2号;感病品种:绥农14、黑河19、黑农35、合丰25。

1.1.2 供试菌种 大豆疫霉根腐病菌1号生理小种。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种植及接种方法 采用盆栽方式种植,在第二对复叶展开后采用伤口涂抹接种法,接种大豆疫霉菌1号生理小种,接种后套袋保湿并放置于阴凉处。

1.2.2 取样方法 接种前及接种24、48、72、96 h后采集各品种叶片3 g,叶片采集后立即放入冰盒中,在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.3 PAL酶液的提取及酶活性的测定方法 取各时期各材料叶片1 g,剪碎后于预冷的研钵中加10 mL  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇硼酸缓冲液(预冷)、0.2 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及少量石英砂迅速研磨至匀浆,匀浆在 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速冷冻离心机上离心15 min,上清液为酶粗提取液(操作均在冰浴上进行)。分别取两只试管,标号,其中1<sup>#</sup>试管为对照,加入:1 mL 酶提取液、3 mL  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液(pH8.8);2<sup>#</sup>试管为测定,加入:1 mL 酶提取液、1 mL  $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  苯丙氨酸、2 mL  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液(pH8.8),反应置 $30^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温1 h,加入0.2 mL  $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸结束反应,用紫外分光光度计在290 nm处测定吸光值,以每小时在290 nm处吸光度变化0.01所需酶量为一单位(相当每毫升反应混合物形成 $1\mu\text{g}$ 肉桂酸)。

## 2 结果与分析

测定了接种疫霉菌1号生理小种前后,苯丙氨酸解氨酶活性的变化。由图1和图2中可以看出,在接种大豆疫霉菌后,叶肉细胞内的苯丙氨酸解氨酶活性呈现一个动态变化的过程,而且无论抗、感病品种都呈现同一规律性的变化,即接种后24 h内酶活性下降,24~48 h酶活性上升,至48 h时出现第一

次峰值,第二次峰值出现在96 h时,这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,苯丙氨酸解氨酶参与大豆植株的次生代谢,最终产生木质素及其他次生产物(酚类、香豆素、黄酮等)等,这些产物具有抵抗大豆疫霉菌侵染的作用。

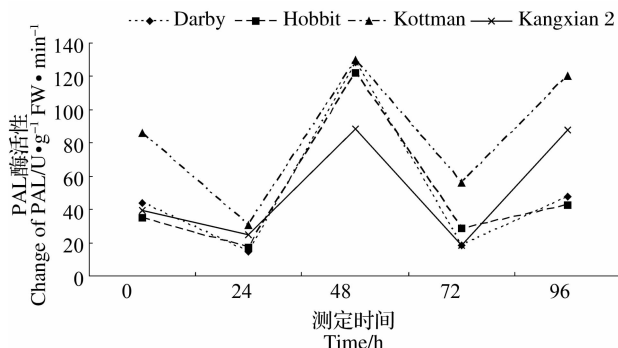


图1 抗病品种接种前后 PAL 活性变化

Fig. 1 Changes of the PAL enzymatic activity in the resistant cultivars

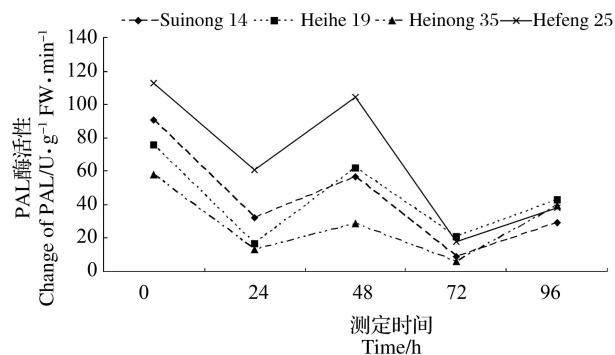


图2 感病品种接种前后 PAL 活性变化

Fig. 2 Changes of the PAL enzymatic activity in the susceptible cultivars

抗、感病品种在接种前后苯丙氨酸解氨酶活性变化的规律相同,但抗、感病品种间存在差异,由图3可以发现,虽然接种后24 h苯丙氨酸解氨酶活性呈现下降趋势,但感病品种的下跌幅度要高于抗病品种;在接种后48 h抗、感病品种都呈现上升的变化趋势,但此时抗病品种酶的活性要高于未接种时的酶活性,而感病品种的酶活性低于未接种时;在接种后72 h抗、感病品种中酶活性都低于未接种时,但感病品种的下跌幅度要高于抗病品种;在接种后96 h时虽然抗、感病品种中酶的活性比72 h都有所上升,但此时抗病品种中酶的活性要高于未接种时,呈现总体上升趋势,而感病品种中酶的活性要低于未接种时,呈现总体下降趋势,抗病品种中抗线2号

酶活性与未接种时相比升高百分比最大,达到 68.03% (图 4)。122.69%,感病品种中绥农 14 酶活性却降低了

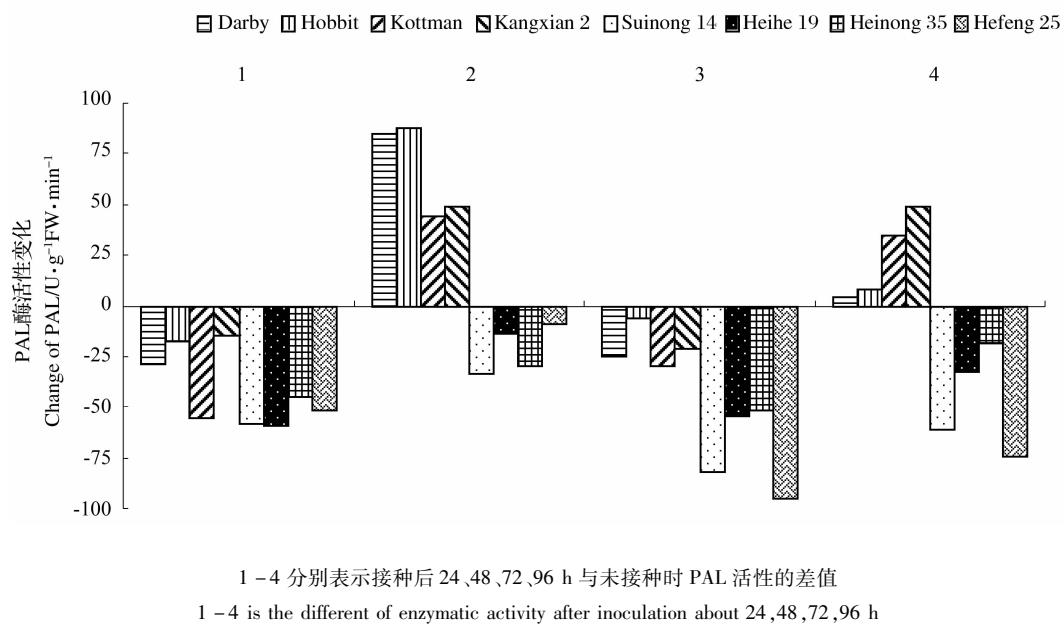


图 3 不同品种接种前后 PAL 活性比较  
Fig. 3 Comparison of PAL enzymatic activity before and after inoculation in different cultivars

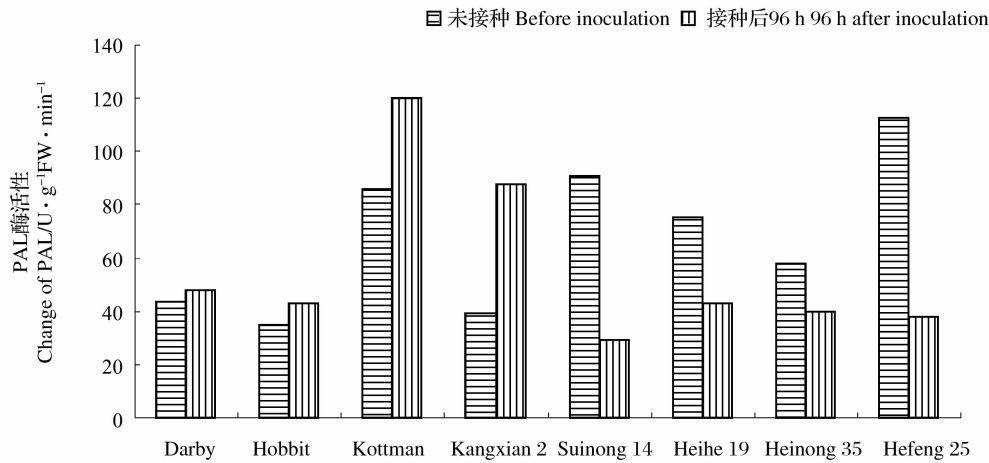


图 4 不同品种接种前及 96 h 后 PAL 活性比较  
Fig. 4 Comparison of PAL enzymatic activity before and 96 hour after inoculation in different cultivars

3 讨论

植物受病原菌侵染后,体内发生着复杂的生理生化变化,以抵抗病原菌的侵入和危害,这些生理生化变化是植物抗病机制的一个方面<sup>[7-10]</sup>。随机选取 8 个抗、感病不同的大豆品种,在接种疫霉根腐病 1 号生理小种前后分别测定叶肉细胞中苯丙氨酸解氨酶活性的变化。苯丙氨酸解氨酶活性呈现动态的变化,抗、感病品种在接种前后苯丙氨酸解氨酶活性

变化的规律大体都是下降、上升、下降、再上升,但是抗性品种在接种后不同时间的酶活性较感病品种的酶活性有上升的趋势,与他人测定的大豆受病害侵染后酶活性变化相同<sup>[11-12]</sup>,与玉米受枯纹病侵染后酶活性变化相似<sup>[13]</sup>,但与受 *Phytophthora capsici* 病菌侵染的南瓜<sup>[14]</sup>、感染野火病菌的烟草<sup>[15]</sup>等感病品种酶活性的上升有所不同,这是由于植物由于受病原菌侵染后发生的生理生化变化,是因寄主的种类(或品种)和病原种类(或小种)组合不同而变化

的,因此同一生理指标的变化特点及其与抗性的关系,在不同寄主与病原的组合中也可能有不同的结论。

## 参考文献

- [1] 李长松,路兴波,刘同金,等.大豆疫霉根腐病菌生理小种的鉴定及品种抗性筛选[J].中国油料作物学报,2001,23(2):60-62. (Li C S, Lu X B, Liu T J, et al. Identification of race of *Phytophthora sojae* and screening of soybean cultivar resistance[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2001, 23(2): 60-62.)
- [2] 吴俊江,刘丽君,高明杰,等.大豆接种疫霉根腐病菌后过氧化物酶活性的变化[J].中国油料作物学报,2003,25(3):67-70. (Wu J J, Liu L J, Gao M J, et al. The change of POD activity in soybean varieties after inoculation with *Phytophthora sojae*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(3): 67-70.)
- [3] 吕慧颖,孔凡江,许修宏,等.东北三省大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗性表现[J].中国油料作物学报,2001,23(4):16-18. (Lu H Y, Kong F J, Xu X H, et al. Response of soybean germplasm from the Northeast China to *Phytophthora root rot* caused by *Phytophthora sojae*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2001, 23(4): 16-18.)
- [4] 马淑梅,李宝英,丁俊杰.大豆疫霉病菌分离鉴定与保存[J].大豆通报,1999(5):8-9. (Ma S M, Li B Y, Ding J J. Examination and reservation for soybean *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Bulletin, 1999(5): 8-9.)
- [5] 江昌俊,余有本.苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J].安徽农业大学学报,2001,28(4):425-430. (Jiang C J, Yu Y B. Research progress for L-phenylalanine ammonia-lyase[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2001, 28(4): 425-430.)
- [6] 曾永三,王振中.苯丙氨酸解氨酶在植物抗病反应中的作用[J].仲恺农业技术学院学报,1999,12(3):56-65. (Zeng Y S, Wang Z Z. Role of phenylalanine ammonia-lyase in plant disease resistance[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Technology, 1999, 12(3): 56-65.)
- [7] 郝再彬,苍晶,徐仲.植物生理学实验技术[M].哈尔滨:哈尔滨出版社,2002. (Hao Z B, Cang J, Xu Zhong. Plant physiological experiment techniques [M]. Harbin: Harbin publishing house, 2002.)
- [8] 陈申宽,闫任沛,王秋荣,等.大豆品种(系)对疫霉根腐病抗性研究[J].内蒙古农业科技,2002(1):12-15. (Chen S K, Yan R P, Wang Q R, et al. Resistant research for phytophthora root rot in soybean cultivars[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2002(1): 12-15.)
- [9] 缪元颖,杨顺楷,刘成君.苯丙氨酸解氨酶的分子生物学研究进展[J].应用与环境生物学报,2002,8(6):672-675. (Liao Y Y, Yang S K, Liu C J. Molecular biological research progress for phytophthora root rot[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2002, 8(6): 672-675.)
- [10] 梁喜龙,郑殿峰,左豫虎.大豆根腐病的研究现状及展望[J].黑龙江八一农垦大学学报,2003,15(4):30-34. (Liang X L, Zheng D F, Zuo Y H. The status of the study and prospect on soybean root rot[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2003, 15(4): 30-34.)
- [11] 刘亚光,李海英,杨庆凯.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[J].大豆科学,2002,21(3):195-198. (Liu Y G, Li H Y, Yang Q K. Study on the relationship between resistance of soybean and activity of PAL in leaves of soybean infected by *Cercospora sojina* hara[J]. Soybean Science, 2002, 21(3): 195-198.)
- [12] 刘丽君,吴俊江,高明杰,等.大豆抗疫霉病菌的生理生化机制[J].中国油料作物学报,2005,27(1):81-83. (Liu L J, Wu J J, Gao M J, et al. Study on the mechanism of soybean resistance to phytophthora root rot[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(1): 81-83.)
- [13] 金庆超,叶华智,张敏.苯丙氨酸解氨酶活性与玉米对纹枯病抗性的关系[J].四川农业大学学报,2003,21(2):116-118. (Jin Q C, Ye H Z, Zhang M. Relationship between the activity of PAL and resistance of corn to maize sheath blight[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2003, 21(2): 116-118.)
- [14] 张俊华,崔崇士.不同抗性南瓜品种感染 *Phytophthora capsici* 病菌后几种酶活性测定[J].东北农业大学学报,2003,34(2):124-128. (Zhang J H, Cui C S. Analysis of different squash cultivars' isozyme in interaction with *P. capsici*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2003, 34(2): 124-128.)
- [15] 魏相峰,汤会君.不同抗性烟草品种感染 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 病菌后几种酶活性测定[J].植物检疫科学,2006,16(2):17-19. (Wei X F, Tang H J. Bioassay of different tobacco cultivars' activity of POD, PPO and PAL in interaction with *Pseudomonas syringae*[J]. Inspection and Quarantine Science, 2006, 16(2): 17-19.)