

## 野生大豆接种大豆疫霉根腐病后苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化

张淑珍<sup>1,2,3</sup>, 靳立梅<sup>3</sup>, 徐鹏飞<sup>3</sup>, 陈维元<sup>4</sup>, 吴俊江<sup>5</sup>, 李文滨<sup>3</sup>, 邱丽娟<sup>6</sup>, 常汝镇<sup>6</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北林业大学 博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 东北农业大学 大豆研究所, 国家教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 黑龙江省农业科学院 绥化分院, 黑龙江 绥化 152052; 5. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 6. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 对大豆疫霉根腐病菌胁迫下抗感不同野生大豆品种根、茎、叶中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化规律进行了研究。结果表明: 在接种疫霉根腐病菌1号生理小种后, 抗病野生大豆根和茎中的PAL活性在病程的大部分阶段比相应对照增加, 并且变化的幅度较大, 而感病品种相反。抗感野生大豆叶中PAL活性与对照相比变化幅度均较小。

**关键词:** 大豆疫霉根腐病; 野生大豆; 苯丙氨酸解氨酶(PAL); 活性变化

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-9841(2009)06-1044-05

## Response of PAL Activity to *Phytophthora sojae* Inoculation in *Glycine soja*

ZHANG Shu-zhen<sup>1,2,3</sup>, JIN Li-mei<sup>3</sup>, XU Peng-fei<sup>3</sup>, CHEN Wei-yuan<sup>4</sup>, WU Jun-jiang<sup>5</sup>, LI Wen-bin<sup>3</sup>, QIU Li-juan<sup>6</sup>, CHANG Ru-zhen<sup>6</sup>

(1. Post-doctoral Working Station of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Post-doctoral Station of Northeast Forestry University, Harbin 150040; 3. Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of National Education Department, Harbin 150030; 4. Suihua Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Suihua 152052; 5. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 6. Crop Science Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** *Phytophthora* root and stem rot caused by *Phytophthora sojae* is a destructive disease in soybean production regions all around the world. Some protective enzymes begin to be active when soybean is infected by *P. sojae*. Of the enzymes, phenylalanine ammonia-lyase(PAL) is a key and rate-limiting enzyme in phenyl propane metabolize pathway which could produce kinds of antimicrobial products. There is abundant wild soybean in China, but there are few reports on the relationship about PAL and resistance of wild soybean to *P. sojae*. In this paper, 4 resistant wild soybeans and 4 susceptible wild soybeans were inoculated with zoospores of *P. sojae* race 1 as treatment and those inoculated with water as control. The PAL activity in roots, stems, and leaves were measured after inoculation of 0, 12, 24, 36, 48, 60, and 72 h in the treatment and control respectively. The results indicated that the PAL activity in roots and stems of resistant wild soybeans was higher than that of the control at most of the stages of pathogenetic process, but was lower than that of control for susceptible wild soybean. The change range of PAL activity in leaves of both susceptible and resistant wild soybeans were relatively low compared with that of control.

**Key words:** *Phytophthora* root and stem rot; *Glycine soja*; PAL; Activity change

大豆疫霉根腐病(*Phytophthora* root and stem rot of soybean)是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann)引起的对大豆危害较大的土传性真菌病害<sup>[1]</sup>。该病于1948年首次在美国的

收稿日期: 2009-06-15

基金项目: 黑龙江省农业科学院博士后基金资助项目(LRB06-010); 中国博士后基金资助项目(20060400835); 国家自然科学基金资助项目(30671317, 30810103063, 30400285); 黑龙江省自然科学基金资助项目(C200814); 黑龙江省新世纪人才培养计划资助项目(NCET-06-007); 博士后落户黑龙江科研启动基金资助项目(LBH-Q05032); 国家重点基础研究发展计划资助项目(2004CB117203-4)。

第一作者简介: 张淑珍(1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail: dnzhangshuzhen@yahoo.com。

通讯作者: 陈维元, 研究员。E-mail: chwy14@163.com;

吴俊江, 副研究员。E-mail: nkywujj@126.com。

印地安那州发现,而后相继在澳大利亚、加拿大、巴西、阿根廷等 20 几个大豆种植国家都有报道<sup>[2-4]</sup>,由于分离技术的原因,我国直到 1991 年才由沈崇尧等首次在黑龙江省分离到该病菌<sup>[5]</sup>,现已构成了严重影响黑龙江省大豆生产的新问题<sup>[6-7]</sup>。疫霉根腐病菌的侵染过程是在病原菌与大豆相互适应的基础上完成的。在受到外界胁迫条件下,如病原菌或致病因子等,植物往往启动一些防御反应酶,其中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢途径中形成多种具有抗菌作用产物的定速酶<sup>[8-10]</sup>。由于该途径中的中间产物(酚类物质)以及终产物(木质素、黄酮、异黄酮类)等物质被认为与植物防御病原物侵染有关,所以该酶被认为是一种植物防御酶。我国是大豆的原产地,存在着丰富的野生大豆资源,现已保存 6 700 多份野生大豆种质资源<sup>[11]</sup>,但是关于 PAL 活性与野生大豆抗疫霉根腐病关系的研究尚未见报道,因此,对大豆疫霉根腐病菌胁迫下的抗感不同野生大豆品种中 PAL 活性的变化进行研究,以期为寄主的抗性机理奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 大豆疫霉根腐病原菌 供试疫霉根腐病菌为 1 号生理小种,该小种是黑龙江省的优势生理小种(由实验室分离保存)。

1.1.2 大豆品种 材料 8 份,包括 4 份抗病野生大豆和 4 份感病野生大豆,由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供(表 1)。供试大豆品种抗感反应是以疫霉根腐病菌 1 号生理小种下胚轴接种后的鉴定结果,抗感标准参照 Yang<sup>[12]</sup>的方法。供试抗病野生大豆 ZYD00388, ZYD00410, ZYD00841 和 ZYD02405 分别用 R1, R2, R3 和 R4 表示;感病野生大豆 ZYD00006, ZYD01153, ZYD02479 和 ZYD02927 分别用 S1, S2, S3 和 S4 表示。

### 1.2 试验方法

1.2.1 CA 培养基的制备过程 将新鲜的胡萝卜洗净,称取 200 g,切成小块放入植物组织搅碎机中搅成匀浆,加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸 30 min 过滤除去残渣,将 20 g 琼脂加入滤液中搅拌融化后,备用。

表 1 供试野生大豆对 *Phytophthora sojae* 1 号小种抗感情况  
Table 1 Reaction of wild soybean tested to *Phytophthora sojae* race

统一编号 Code	来源地 Origin	死亡率 Mortality/%	抗感性 Reaction
ZYD00388	黑龙江 Heilongjiang	0	R
ZYD00410	黑龙江 Heilongjiang	0	R
ZYD00841	吉林 Jilin	0	R
ZYD02405	辽宁 Liaoning	0	R
ZYD00006	黑龙江 Heilongjiang	100	S
ZYD01153	吉林 Jilin	100	S
ZYD02497	辽宁 Liaoning	100	S
ZYD02927	山西 Shanxi	100	S

R; Resistant; S; Susceptible

1.2.2 菌种的扩繁 将 CA 培养基和空培养皿在一个大气压下灭菌 20 min 后,放置于超净工作台冷却,再将 15 mL CA 培养基倒入直径为 10 cm 的已灭菌的培养皿中,冷却后制成 CA 固体培养基,然后用接种针将活化的病原菌接种于平皿中央,倒置于 25℃ 温箱中培养 8 d。

1.2.3 游动孢子悬浮液的制备 参照文献[13],略有改动,用打孔器在 CA 平板菌落边缘内侧打孔,挑取 8~10 块菌丝块转入灭菌的三角瓶内,加入 20 mL CA 液体培养基,25℃ 黑暗培养 3 d,换到土壤浸出液中,光暗交替。25℃ 培养 1~2 d 可见大量孢子囊形成。将产生大量孢子囊的三角瓶内的土壤浸出液置换成 20 mL 无菌蒸馏水,置 4℃ 冰箱中 20~30 min 后,取出置于 25℃ 培养,30 min 后即有大量游动孢子释放,6 h 后游动孢子大量产生。用无菌水配制成浓度大约为  $1 \times 10^5$  个孢子·mL<sup>-1</sup> 游动孢子悬浮液,置室温下保存待用。

1.2.4 接种方法 采用游动孢子全苗接种法:将真叶完全展开的野生大豆用水将盆土充分浸泡,将泥土轻轻倒出,用流水慢慢冲洗,洗净根上所有附泥,然后将整个植株根部浸没在游动孢子悬浮液中,以蒸馏水为对照。接种后将处理和对照同样保温(25~30℃)保湿。

1.2.5 取样方法 接种后 0、12、24、36、48、60、72 h 连续取样,每次取各供试野生大豆的整个植株,用无菌冰水洗净擦干,液氮冷冻后保存在 -20℃ 的冰柜中备用。

1.2.6 酶液提取 参照李合生<sup>[14]</sup>的方法,并稍作修改。称取 0.2 g 叶片,加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH = 7.8 的磷酸缓冲液 4 mL,冰浴研磨匀浆后于  $10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$

4℃下离心 20 min,取上清液,置于冰箱中备用。

1.2.7 酶活性测定 参照郝再彬等<sup>[15]</sup>的方法,在 5 mL反应体系中,含 80 μL 酶液,3.92 mL 样品提取液和 1 mL 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 苯丙氨酸溶液,对照以 1 mL 缓冲液代替苯丙氨酸溶液。反应体系于 40℃ 水浴中保温 60 min 后,立即加入 0.2 mL 3 mol·L<sup>-1</sup> 终止反应,随后测定 OD<sub>290 nm</sub> 值。酶活性为 OD<sub>290 nm</sub> · g<sup>-1</sup> FW · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>。每个样品酶液重复测定 3 次。样品 PAL 活性以下述公式计算。

$$\text{苯丙氨酸解氨酶活性} = \frac{\text{OD}_{290 \text{ nm}} \times N}{W \times T \times n \times d}$$

其中, *N*-酶提取液总体积 (mL), *W*-样品鲜重 (g), *T*-反应时间 (min), *n*-反应体系中所用酶液体积 (mL), *d*-比色皿直径 (cm)。

$$\text{PAL 活性变化率} = (A_1 - A_0) / A_0 \times 100$$

其中, *A*<sub>1</sub> - 接种后供试野生大豆根、茎、叶 PAL

活性(OD<sub>290 nm</sub> · g<sup>-1</sup>FW · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>); *A*<sub>0</sub> - 未接种植株根、茎、叶 PAL 活性(OD<sub>290 nm</sub> · g<sup>-1</sup>FW · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种后抗感野生大豆根中 PAL 活性的变化

由图 1 可以看出:接种大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种后,抗病野生大豆根中 PAL 活性在病程的大部分阶段比相应对照活性高,感病野生大豆相反。在病程的个别阶段抗病野生大豆根中 PAL 活性有低于对照的情况,如 R1 接种后 24、36 h, R2 接种后 12、24、36 h, 和 R4 接种后 36、60 h;感病野生大豆 S1 和 S3 根中 PAL 活性也有高于对照的情况。这些不同的变化趋势正反映出 PAL 在野生大豆与疫霉根腐病菌相互作用过程中的动态规律,但总体而言,抗病野生大豆根中 PAL 活性增加幅度要高于感病野生大豆。

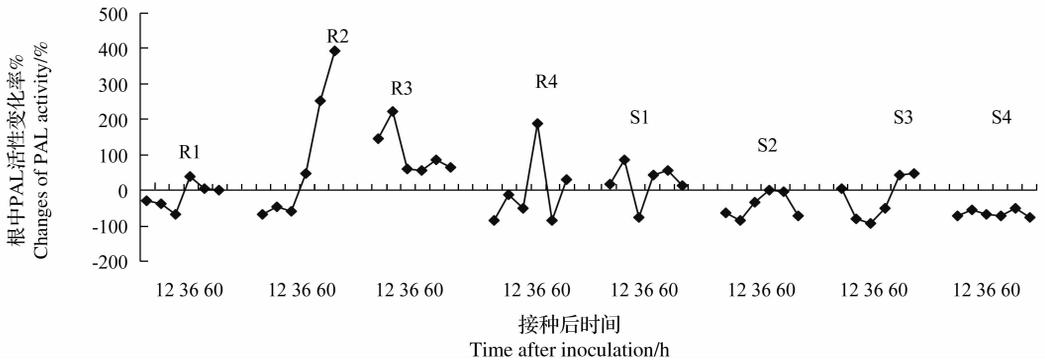


图 1 接种疫霉根腐病菌后抗感野生大豆根中 PAL 活性的变化率

Fig. 1 Changes of PAL activity in roots of wild soybean infected by *P. sojae*

接种大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种后,抗病野生大豆在病程的大部分阶段茎中 PAL 活性较对照增加,有个别阶段活性降低,但幅度较小。感病野

生大豆在病程的大部分阶段 PAL 活性较对照降低 (图 2)。

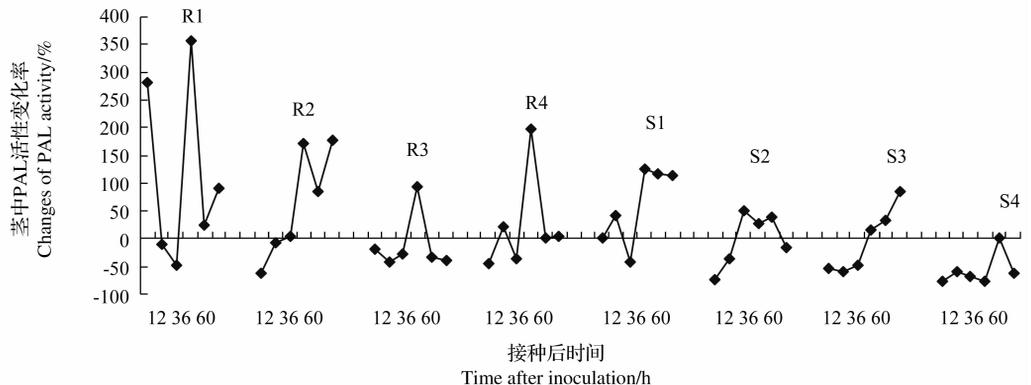


图 2 接种疫霉根腐病菌后抗感野生大豆茎中 PAL 活性的变化率

Fig. 2 Changes of PAL activity in stems of wild soybean infected by *P. sojae*

由图 3 可以看出:接种大豆疫霉根腐病菌后在病程的大部分阶段,抗感野生大豆叶中 PAL 活性与对照相比变化不大。

综上所述,在接种疫霉根腐病菌 1 号生理小种

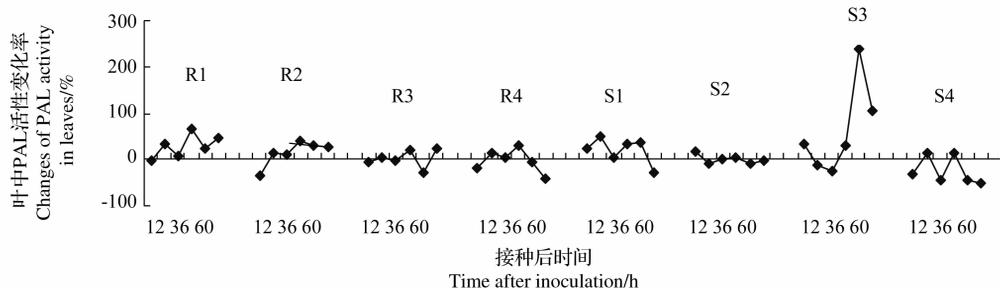


图 3 接种疫霉根腐病菌后抗感野生大豆叶中 PAL 活性的变化率

Fig. 3 Changes of PAL activity in leaves of wild soybean infected by *P. sojae*

### 3 讨论

植物的防御体系是一个多因素相互作用的复杂体系,其中包括与木质素及沉积相关的苯丙烷类代谢有关的酶、植保素诱导合成、病程相关蛋白 PRS 和磷酸是戊糖途径及乙醛酸循环等途径的相关因子<sup>[16]</sup>。苯丙氨酸类代谢的第一个关键酶就是苯丙氨酸解氨酶(PAL)。它催化苯丙氨酸脱氨后产生肉桂酸并最终转化为木质素,木质素可以加强细胞壁,增加组织木质化的程度形成病原菌入侵的机械屏障。

PAL 作为植物苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,因而被认为是植物的防御酶之一,其活性的强弱,与植物的抗性反应密切相关。贺字典等<sup>[17]</sup>在玉米丝黑穗病菌感染玉米后,曾永三等<sup>[18]</sup>在接种豇豆锈菌后均发现抗性材料叶片的 PAL 的酶活性与感病品种相比,升高的幅度较大,而且高酶活持续的时间较长。崔彦玲等<sup>[19]</sup>研究番茄品种的抗病性与其接种后 PAL 酶活性变化百分比呈极显著正相关。该试验结果表明,野生大豆接种疫霉根腐病菌后,抗病野生大豆根和茎中的 PAL 活性在病程的大部分阶段均比相应对照增加,使得植株的次生代谢物与大豆疫霉根腐病菌相抗衡;而感病野生大豆根和茎中的 PAL 活性在病程的大部分阶段均比相应对照降低,而抗感野生大豆叶中 PAL 活性与对照相比变化不大。

### 参考文献

[1] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of phytophthora root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69:362-368.

后,抗病野生大豆根和茎中的 PAL 活性在病程的大部分阶段比相应对照增加,并且变化的幅度较大,而感病品种相反。抗感野生大豆叶中 PAL 活性与对照相比变化幅度均较小。

[2] Hildebrand A A. A root and stalk rot caused by *P. me. var. sojae* [J]. Canadian Journal of Botany, 1959, 37:927-957.

[3] Jee Hyeongjin. Occurance of Phytophthora root rot on soybean and indentification of the causal fungus[J]. RAD Journal of Crop Protection, 1998, 40:16-22.

[4] Pegg K G, Kochman J K, Vock N T. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in Australia [J]. Plant Pathology, 1980, 9:15.

[5] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(3):298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(3):298.)

[6] 徐永华, 卢启, 何志鸿, 等. 大豆疫霉病早熟抗源[J]. 大豆通报, 1999(3):23-25. (Xu Y H, Lu Q, He Z H, et al. Early-maturity soybean varieties resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Bulletin, 1999(3):23-25.)

[7] 李宝英, 马淑梅, 丁俊杰. 大豆疫霉病发生危害及影响其发生因素的探讨[J]. 植物保护, 1999, 25(5):8-11. (Li B Y, Ma S M, Ding J J. Investigations of soybean phytophthora root rot disease and its determinant factors [J]. Plant Protection, 1999, 25(5):8-11.)

[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):373-375. (Wang J W, Xue Y L. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL)- I [J]. Acta Photophysiological Sinica, 1981, 7(4):373-375.)

[9] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 II [J]. 植物生理学报, 1982, 8(1):35-37. (Wang J W, Xue Y L. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL)- II [J]. Acta Photophysiological Sinica, 1982, 8(1):35-37.)

[10] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 III [J]. 植物生理学报, 1982, 8(3):273-275. (Wang J W, Xue Y L. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL)- III [J]. Acta Photophysiological Sinica, 1982, 8(3):273-275.)

[11] 庄炳昌. 中国野生大豆研究二十年[J]. 吉林农业科学, 1999,

24(5):3-10. (Zhuang B C. Researches on wild soybean( *Glycine soja*) in China for twenty years [J]. *Jilin Agricultural Sciences*, 1999,24(5):3-10.)

[12] Yang X B, Ruff R L, Meng X Q, et al. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields[J]. *Plant Disease*, 1996, 80:1418-1420.

[13] 左豫虎, 臧忠婧, 刘锡若. 影响大豆疫霉菌游动孢子产生的条件[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(3):241-245. (Zuo Y H, Zang Z J, Liu T R. Studies on production condition of zoospores of *Phytophthora sojae* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31(3):241-245.)

[14] 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. (Li H S. Principle and experimental technology of plant biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.)

[15] 郝再彬. 植物生理学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004, 24-38. (Hao Z B. Plant physiology experiment [M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2004:24-38.)

[16] 吴岳轩, 曾宝华, 王容臣. 杂交稻对白叶枯病菌的诱导抗性与细胞内防御酶关系的初步研究[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(2):127-131. (Wu Y X, Zeng B H, Wang R C. A Preliminary

study on the relationship between induced resistance to bacterial blight and defense enzymes in hybrid rice seedlings[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1996, 26(2):127-131.)

[17] 贺字典, 高增贵, 庄敬华, 等. 玉米丝黑穗病菌对寄主防御相关酶活性的影响[J]. *玉米科学*, 2006, 14(2):150-155. (He Z D, Gao Z G, Zhuang J H, et al. Effect of maize head smut pathology (*Sphacelotheca reiliana*) on the major defensive enzymes of host [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2006, 14(2):150-155.)

[18] 曾永三, 王振中. 豇豆与锈菌互作中的多酚氧化酶和过氧化物酶活性及其与抗病性的关系[J]. *植物保护学报*, 2004, 31(2):145-150. (Zeng Y S, Wang Z Z. Relationships between activities of polyphenol oxidase and peroxidase, and resistance of cowpea to *Uromyces vignae*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2004, 31(2):145-150.)

[19] 崔彦玲, 张环. 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相关性[J]. *华北农学报*, 2003, 18(1):79-82. (Cui Y L, Zhang H. Correlation analyses between resistance to *cladosporium fulvum* and PAL activity in tomato [J]. *Acta Agriculturae Boreall - Sinica*, 2003, 18(1):79-82.)

(上接第 1043 页)

[12] 任瑞娴, 王瑞卿, 许恩怀, 等. 冬小麦-夏玉米轮作区动态平衡施肥配方的研究[J]. *天津农学院学报*, 2006, 13(2):1-6. (Ren R X, Wang R Q, Xu N H, et al. Dynamically balanced fertilization with formulations in winter wheat-summer maize rotation system [J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2006, 13(2):1-6.)

[13] 杜伟. 不同施肥制度土壤生物肥力特征研究[D]. 中国农业科学院, 2006. (Du W. Study on soil biological fertility of different fertilization systems [D]. Chinese Agriculture Academy of Science,

2006.)

[14] 刘恩科. 不同施肥制度土壤团聚体微生物学特性及其与土壤肥力的关系[D]. 中国农业科学院, 2007. (Liu E K. Microbiological features of soils under different fertilization systems and their related soil fertility [D]. Chinese Agriculture Academy of Science, 2007.)

[15] Berndtsson R, Bahri A, Jimno K. Spatial dependence of geochemical elements in a semiarid agricultural field II Geostatistical properties [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57:1323-1329.

## 2010年《黑龙江农业科学》征订启事

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被中国科学引文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、CNKI 系列数据库、万方数据库、重庆维普中文科技期刊数据库和华艺电子出版事业群等多家权威数据库收录。

2010年《黑龙江农业科学》将由双月刊改为月刊,届时,内容、栏目将更加丰富、新颖,更具时效性和可读性。每月10日出版,国内外公开发行。国内邮发代号14-61,每期定价5.00元,全年60.00元;国外发行代号BM8321,每期定价8.00美元,全年96.00美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

另外,编辑部现有少量2007~2008年合订本珍藏版。2007年每册80.00元,2008年每册90.00元,邮费各10.00元,售完为止。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《黑龙江农业科学》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86668373 电子信箱:nykx13579@sina.com