

锈菌侵染后花生体内主要生化指标的变化 及其与抗性的关系

李 盾 * 王振中 林孔勋

(华南农业大学植保系, 广州, 510642)

摘要 利用具有不同程度抗性的 5 个花生品种, 测定其受锈菌侵染前后有关生化指标如蛋白质、碳水化合物、氨基酸、核酸等的变化过程。结果表明, 在健叶中碳水化合物与抗/感病性的关系基本上是碳水化合物含量越高的品种越感病, 受侵染以后, 总糖量病/健比值一般都小于 1, 说明本病是高糖病害。在侵染后 12 h 时, 越抗病的品种其蛋白质病/健比值越大。病叶中核酸总量比健叶有小幅上升, 但与抗性无明显相关关系。受锈菌侵染后出现含硫的胱氨酸和芳香族的酪氨酸, 且有几种氨基酸在侵染后呈现一定程度上的数量变化, 其中组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和丙氨酸等的变化与抗病性有一定程度的相关, 亮氨酸和丙氨酸尤为明显。

关键词 花生; 锈病; 抗病性; 病理生理

中图分类号 S432.23

植物受病原物侵染以后, 会在体内产生一系列代谢变化, 如蛋白质、酶、碳水化合物、氨基酸、核酸等组分的种类、含量或活力的改变, 这些变化与寄主的抗病性有一定的相关性(Ekbote et al, 1983; Ekbote et al, 1984; Pateet et al, 1986; Reddy et al, 1977)。近 20 多年来, 寄主的代谢反应及其与抗病性的关系, 是抗病性生理研究的主要内容之一(Cruickshank, 1980; Ekbote et al, 1983; Ekbote et al, 1984; Patel et al, 1986; Reddy et al, 1977; Schlosser, 1980)。

花生锈病(*Puccinia arachidis* Speg.) 是华南地区对花生生产危害较大的病害之一。在世界上许多地区也普遍发生, 造成很大的经济损失(李盾等, 1991; Subrahmanyam et al, 1983)。对花生抗锈病性生理的研究表明, 受锈菌侵染后, 花生体内的多种酶、蛋白质、游离氨基酸、碳水化合物等物质的含量(活力)都会发生变化(李盾等, 1991; Ekbote et al, 1983; Ekbote et al, 1984; Patel et al, 1986; Reddy et al, 1982; Reddy et al, 1977), 但是, 这些变化与抗病性关系的研究却很少(李盾等, 1991)。

Ekbote 等(1983, 1984)发现, 受锈菌侵染后, 花生植株体内的还原糖和氨基酸在侵染初期增大, 后来比健株低, 感病品种总糖增加, 抗病品种保持不变。在感病品种中, 过氧化物酶、多酚氧化酶、抗坏血酸酶活性在显症前明显增强, 而抗病品种变化不大, 但这一研究也仅表明受锈菌侵染后感病和抗病两种品种间在这些方面的差异, 没有进一步分析这些差异与抗锈病性的关系, 因而难以推测在上述变化中, 到底哪些生化指标才是花生抗病性的基本指标。

Subrahmanyam 等(1983)发现: 无论是在感病或抗病的花生品种上, 锈菌夏孢子均能萌发且从气孔侵入, 其进入率与品种抗病性无关, 但病菌在寄主体内的扩展则明显受寄主抗病性的抑制。Cook(1972)也曾明确指出花生的抗锈性主要是由生理抗病性控制的。

有关研究(陈春来等, 1981; Mehta et al, 1978)表明, 花生栽培品种中仅有不同程度的抗锈病性, 很难找到完全抗病或免疫品种。因此, 在不同抗锈病性的花生品种中分析有关生化指

1994-01-31 收稿

* 我校 89 届毕业生, 现在广东省微生物研究所工作。

标的变化及其与抗病性的关系,对了解花生抗锈病机制,具有较大的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 供试植物

供试花生品种(*Arachis hypogaea* Linn.)为粤油 39(GO39,感病级数 0.5);汕油 27(SO27, 1.5~2级);粤油 223(GO223, 2.5~3级);粤油 551-116(GO551-116, 3.5~4级);粤油 187-93(GO187-93, 4~4.5级)。品种的感病等级表示品种的田间抗病性,0级为无病,5级为全株叶片均发病(李盾等,1991)。

上述品种花生在室内盆栽种植,每次 5 盆,每盆 5 株,盛花期进行接种试验。

1.2 供试菌种和接种方法

花生锈菌采自广东省农科院、本校实验农场和番禺县的花生田,在温室内花生植株上繁殖备用。

接种时,从病叶上刮下夏孢子粉,制成孢子悬浮液,用小喷雾器喷雾接种。夏孢子悬浮液的浓度为:在 10×16 倍显微镜下每视野 50~60 个夏孢子。

每个品种取 3 盆花生,随机排列,接种时尽量使每植株接受的菌量一致。接种后即用塑料薄膜袋保湿 24 h,在室温 22~32℃ 下培养。未经接种的植株作同样的保湿及培养。

1.3 取样方法

分别从 5 个品种植株的不同叶位的复叶上取样,不接种的植株以相同的方法取样作健康对照。于接种前 12 h、接种后 12、24、48、96 和 276 h(显症)各取样 1 次。

1.4 生化指标的测定

1.4.1 游离氨基酸的测定 分别取各处理的花生叶片 0.5 g 研磨,加入 2 mL 5% 磺基水杨酸匀浆,用 3 mL 无离子水将匀浆洗入离心管,在 10 000 r/min 高速离心 15 min,吸取 2 mL 上清液于试管中,加入 3 mL 无离子水,此时样本的 pH 值在 2.0~2.5 范围。用日立-835 氨基酸自动分析仪测定游离氨基酸的种类及含量,进样量为 50 μL。

1.4.2 蛋白质含量的测定 分别取各处理叶片 1 g,按 Bradford(1976)的考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量,以牛血清蛋白制作标准曲线。

1.4.3 碳水化合物含量的测定 可溶性总糖用蒽酮比色法(李安妮等,1983)测定,还原糖含量用 3,5-二硝基水杨酸法(北京大学生物系生物化学教研室,1977)测定。样品量均为 1 g。以葡萄糖制作标准曲线。

1.4.4 核酸含量的测定 核酸含量用朱治平(上海植物生理学会,1985)的方法测定。

蛋白质、碳水化合物和核酸含量测定均用日本产岛津 uv-120-02 型分光光度计检测。

上述生化指标除游离氨基酸设 1 个重复外,其余均设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 碳水化合物的动态变化

在健康花生叶片中,越感病的品种其可溶性总糖和还原糖的含量越大(表 1)。

花生受锈菌侵染后,植株中可溶性总糖的病/健比值除个别情况外基本上变化不大。从总体上来说是有下降,但程度较小,品种间的差异也较小。可溶性总糖的变化与抗病性似乎没有明显相关性(表 2)。

在侵染初期(12 h),除高抗品种(GO39)外,还原糖含量均比健株增大(病/健比>1),但随后各品种的比值均相应地出现下降,下降的程度在最感病的品种尤为明显。由此可见,锈菌侵染后需要消耗还原糖,但在不同的品种中,其消耗时间不同。

2.2 核酸含量的动态变化

受锈菌侵染后花生叶片中的核酸总量、DNA 和 RNA 含量的病/健比值的变化如表 3 所示。总的来看,核酸总量病/健比值接近于 1。RNA 和 DNA 含量虽有变化,但与抗病性似乎无相似趋势。

表 1 花生品种抗锈病性与碳水化合物含量的关系(mg/g·fw)

组 分	品 种	重 复		
		I	II	III
可 溶 性 总 糖	GO39	13.52	19.24	18.36
	SO27	13.04	20.84	18.48
	GO223	13.88	21.84	19.00
	GO551-116	19.24	21.72	20.32
	GO187-93	16.08	22.44	21.04
还 原 糖	GO39	1.58	2.38	1.62
	SO27	1.59	1.88	1.88
	GO223	1.62	2.50	2.73
	GO551-116	1.82	2.36	2.69
	GO187-93	2.58	2.46	3.41

表 2 花生受锈菌侵染前后碳水化合物含量病/健比值的变化⁽¹⁾

组 分	品 种	侵 染 后 时 间/h				
		12	24	48	96	276
可 溶 性 总 糖	GO39	0.923	0.378	0.970	0.879	0.832
	SO27	1.052	0.932	0.833	0.935	0.935
	GO223	1.103	0.838	0.992	0.946	0.905
	GO551-116	0.787	0.760	0.928	0.940	0.895
	GO187-93	1.208	0.809	0.866	0.946	0.882
还 原 糖	GO39	0.892	1.006	0.831	1.092	1.181
	SO27	1.060	1.094	1.345	0.898	1.169
	GO223	1.013	0.919	0.800	0.912	0.953
	GO551-116	1.121	0.868	0.991	0.925	0.675
	GO187-93	1.485	0.655	1.101	0.621	1.567

(1)侵染前比值为1。

表 3 花生受锈菌侵染前后核酸含量病/健比值的变化⁽¹⁾

组 分	品 种	侵 染 后 时 间/h		
		12	36	60
总 核 酸	GO39	1.011	1.013	0.965
	SO27	1.022	1.031	1.047
	GO223	0.993	1.050	1.052
	GO551-116	0.993	1.048	1.045
	GO187-93	1.004	1.027	1.038
A Z D	GO39	1.031	1.072	0.980
	SO27	0.776	1.258	0.804
	GO223	0.875	0.812	0.989
	GO551-116	1.121	0.954	1.014
	GO187-93	1.238	0.933	1.248
A Z R	GO39	1.005	0.993	0.961
	SO27	1.120	0.969	1.107
	GO223	1.033	1.154	1.067
	GO551-116	0.954	1.093	1.052
	GO187-93	0.939	1.057	0.993

(1) 侵染前比值为 1。

2.3 蛋白质含量的动态变化

受侵染后,感病品种花生叶片中的蛋白质含量在 12 h 时明显比对照低(病/健比值<1),随后即回升至超过健康叶片水平(病/健比值>1、表4)。而在抗性品种中病/健比值一直都大于1,仅SO27在显症时略有下降,但也仍接近于1。在中抗品种GO223中只在12 h 时稍有下降,其变化程度介于高感与高抗之间。由此看来,蛋白质含量变化与抗病性有关的规律是明显的。

2.4 游离氨基酸含量的动态变化

在锈菌侵染前后花生植株内所含的游离氨基酸种类有所不同。在侵染前,可测到天冬氨酸、丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、精氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、组氨酸和亮氨酸等 12 种,侵染后,除上述氨基酸外,还有酪氨酸(12 h 和 36 h)和胱氨酸(36 h)出现,但在 276 h 此 2 种氨基酸则测不到。这

些结果表明,不同抗性程度的 5 个品种的氨基酸种类是相同的,看来游离氨基酸的种类与抗病性无关。

受锈菌侵染后,花生叶片中除出现上述的两种新有氨基酸外,其余 12 种氨基酸含量的病/健比值都有不同程度的变化(表 5)。许多种类的氨基酸的病/健比值在 12 h 时明显下降,如缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、组氨酸、亮氨酸和丙氨酸。这些比值下降的趋势,基本上是随着感病性的增高而愈益降低。氨基酸总量有类似的变化,在侵染初期病/健比值略有下降,随即回升。

有的氨基酸在花生受侵染后的病/健比值变化与抗病性关系特别明显,如亮氨酸不但非常有规律地在越感病的品种中降低越明显,且在高抗品种 GO39 中反而明显提高。

3 结论与讨论

本研究测定了花生受锈菌侵染后其体内主要生化组分的变化,结果表明,碳水化合物、蛋白质及游离氨基酸的有关组分在植株体内的含量或在锈菌侵染后的变化与抗病性有一定的关系。

健康花生叶片中可溶性总糖和还原糖含量越高,品种越感病。这个规律说明,花生锈菌与小麦相似(Forsyth et al, 1958; Lyles et al, 1959),是一种高糖病害。

从总体来说,受锈菌侵染后,花生叶片中的可溶性总糖比对照健叶有所下降,仅部分品种在侵染后 12 h 有所上升,但很快也下降。这一结果与 Ekbote 等(1983)认为受锈菌侵染后感病品种可溶性总糖增加,抗病品种保持不变的说法有所不同。不过可溶性总糖的下降程度不大,而且各品种间的差异也不大,看来与抗病性关系不大。但还原糖含量则普遍下降,虽然出现下降的时间在各品种中不尽相同,但下降的趋势是明显的,特别是在高感品种中下降程度尤大。这种变化显然与抗病性有关。在越感病品种中还原糖消耗越多。这就进一步说明花生锈病是一种高糖病害。至于在 12 h 时在感病品种中一致出现还原糖的病/健比值增大超过 1(但很快便下降)的现象,则可能是由于病菌孢子在此时萌发繁殖并侵入植物组织,需要大量能量,作用于糖的酶类的活性特别高的结果。

花生植株受锈菌侵染后,出现新的氨基酸如含硫的胱氨酸和芳香族的酪氨酸,有研究表明,含硫氨基酸和芳香族氨基酸具抵抗真菌和细菌的作用(Matimuthu et al, 1983; Ragunathan et al, 1966)。推测这两种氨基酸的出现可能是寄主对外来真菌作出的主动反应。但本研究却未发现氨基酸种类与抗病性的直接关系。不过,锈菌侵染后会引发某些氨基酸如缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和组氨酸等的病/健比值出现较大幅度的变化。在游离氨基酸总量方面,Reddy 等(1977)指出,受锈菌侵染以后,花生叶片中结合到蛋白质的氨基酸增

表 4 花生受锈菌侵染前后蛋白质含量病/健比值的变化⁽¹⁾

品 种	侵 染 后 时 间/h				
	12	24	48	96	276
GO39	1.146	1.098	1.064	1.072	1.007
SO27	1.062	1.093	1.223	1.575	0.929
GO223	0.981	1.059	0.905	1.153	1.056
GO551-116	0.770	0.849	0.955	0.954	1.029
GO187-93	0.766	0.964	0.977	1.490	0.691

(1) 侵染前比值为 1。

表 5 花生受锈菌侵染前后氨基酸含量病/健比值的变化⁽¹⁾

组 分	品 种	侵 染 后 时 间/h			组 分	品 种	侵 染 后 时 间/h		
		12	36	276			12	36	276
苏	GO39	0.309	0.807	0.915	蛋	GO39	1.067	1.162	
	SO27	0.555	1.146	1.059		SO27	0.877	0.992	
氨	GO223	0.853	1.257	0.955	氨	GO223	1.003	0.901	
	GO551-116	1.092	0.811	1.438		GO551-116	1.612	0.936	
酸	GO187-93	0.904	1.391	1.056	酸	GO187-93	0.515	0.650	
缬	GO39	1.090	1.324	0.982	亮	GO39	2.007	1.180	
	SO27	0.791	1.049	1.758		SO27	0.891	1.019	
氨	GO223	0.843	1.136	1.412	氨	GO223	0.816	1.200	
	GO551-116	1.176	1.124	1.845		GO551-116	0.766	1.277	
酸	GO187-93	0.940	0.940	1.486	酸	GO187-93	0.636	0.698	
异	GO39	0.825	1.220	1.066	天	GO39	0.903	0.914	0.759
	SO27	0.768	1.076	1.138		SO27	0.733	1.290	0.961
亮	GO223	0.844	1.080	1.121	氨	GO223	0.761	1.016	0.887
	GO551-116	0.812	1.087	1.681		GO551-116	1.066	0.821	0.896
酸	GO187-93	0.712	0.924	1.277	酸	GO187-93	0.873	1.439	1.063
苯	GO39	0.887	1.067	0.031	丙	GO39	0.892	0.849	0.837
	SO27	0.726	1.402	1.852		SO27	0.488	1.160	0.850
丙	GO223	0.719	1.104	1.271	氨	GO223	1.044	1.048	0.887
	GO551-116	0.892	1.029	1.836		GO551-116	0.942	0.973	0.895
酸	GO187-93	1.015	1.198	1.887	酸	GO187-93	0.781	1.675	1.016
赖	GO39	1.900	1.085	1.151	丝	GO39	0.778	0.765	1.270
	SO27	0.806	1.242	1.306		SO27	0.490	1.616	0.744
氨	GO223	0.945	1.125	1.146	氨	GO223	1.115	0.685	0.737
	GO551-116	0.771	0.872	1.637		GO551-116	0.733	0.769	0.855
酸	GO187-93	0.899	0.911	1.386	酸	GO187-93	0.949	0.987	1.500
组	GO39	0.660	1.028	1.016	氨	GO39	0.776	0.540	0.942
	SO27	0.406	1.139	0.883		基	SO27	0.623	1.307
氨	GO223	1.138	1.035	0.618	酸	GO223	0.940	0.932	0.871
	GO551-116	0.881	0.681	1.381		总	GO551-116	0.980	0.805
酸	GO187-93	0.471	1.056	1.817	量	GO187-93	0.871	1.289	1.248
精	GO39	0.490	3.535	2.275					
	SO27	0.182	1.612	1.488					
氨	GO223	2.801	0.592	0.740					
	GO551-116	0.730	0.328	1.662					
酸	GO187-93	2.253	0.947	2.686					

(1)侵染前比值为 1。
加了 1 ~3 倍,游离氨基酸总量相对下降,我们的结果与这观点是一致的。

很有意义的是,丙氨酸在 276 h 时在 5 个品种中其病/健比值有规律地随着感病性的提高而增大,在高感品种中特别高,276 h 是显症时期,在此时有大量的孢子形成。众所周知在许多时候丙氨酸的存在是有利于孢子的形成的。

不同品种的蛋白质含量病/健比值在侵染后均有变化,较抗病的品种在侵染后 12 h 即出现病/健比值升高大于 1 的现象,其它品种在 12 h 时却有一定程度的降低,以后才逐渐增大到大于 1,基本上是越感病的提高得越迟。虽然这种变化与抗病性的关系还可以进一步探讨,但是侵染后 12 h 时的变化与抗病性关系的规律比较明显,初步看来可考虑作为花生抗锈病性的重要指标。

本文分析了受锈菌侵染前后花生体内多种生化指标变化过程及其与抗锈病性的关系,指出某些生化组分的变化与寄主的抗病性有一定的关系,有的还比较明显。但实际上,寄主对病原物的抗性是由一系列生理生化过程决定的,其抗性与寄主体内的多种化合物种类及其含量有关(Cruickshank,1980;Schlosser,1980)。因而,我们认为,要全面了解抗病性的生理生化机制,更理想的做法应该是从多组分的综合作用进行分析。本研究仅在这方面进行一些基础工作,供今后的研究参考。

参 考 文 献

- 上海植物生理学会主编. 1985. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 45
- 北京大学生物系生物化学教研室编. 1977. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 22~24
- 李 盾, 王振中, 林孔勋. 1991. 花生体内几种酶的活性与抗锈病性的关系. 华南农业大学学报, 12 (3): 1~6
- 李安妮, 刘敏敏, 庾翠梅, 等. 1983. 用蒽酮法测定花生荚果的可溶性总糖和淀粉. 中国油料, (3): 50~52
- 陈春来, 段乃雄, 李文溶, 等. 1981. 花生品种资源锈病抗性鉴定. 中国油料, (1): 48~50
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem*, 72: 248~254
- Cook M. 1972. Screening of peanut for resistance to peanut rust in the greenhouse and field. *Plant Disease Reporter*, 56(5): 382~386
- Cruickshank I A M. 1980. Defenses triggered by the invader: chemical defenses. In: Horsfall J G, Cowling E B, eds. *Plant Disease Vol 5*. New York: Academic Press, 247~267
- Ekbote A U, Mayee C D. 1983. Biochemical changes in rust (*Puccinia arachidis*) resistant and susceptible varieties of groundnut after inoculation. *Indian Phytopath*, 36(1): 194
- Ekbote A U, Mayee C D. 1984. Biochemical changes due to rust in resistant and susceptible groundnuts. *Indian Journal of Plant Pathology*, 2(1): 21~26
- Forsyth P R, Samborski D J. 1958. The effect of various methods of breaking resistance on stem rust reaction and content of soluble carbohydrate and nitrogen in wheat leaves. *Can J Bot*, 36: 717~723
- Lyles W E, Futrell M C, Atkins I M. 1959. Relationship between reaction to race 15B of stem rust and reducing sugars and sucrose in wheat. *Phytopathology*, 49: 254~256

- Matimuthu T, Kandaswamy T K. 1983. Changes in the amino nitrogen and amino acids in the mung lines moderately resistant and susceptible to bacterial leaf blight organism. *Indian Phytopathology*, 36(2): 345 ~ 358
- Mehta P P, Mandal K K. 1978. Field screening of groundnut cultures against rust and tikka. *Indian Phytopath*, 31(2): 259 ~ 260
- Patel V A, Vainshnav M U. 1986. Biochemical changes in rust infected leaves of groundnut. *Indian J Mycol and Pl Pathol*, 16: 305 ~ 306
- Ragunathan V A M, Rangaswami G. 1966. A comparative study of the resistant and susceptible banana varieties to fungal diseases. *Indian Phytopathology*, 19: 141 ~ 149
- Reddy M N, Gopal G R. 1982. Changes in organic acids and sugars in the rust-infected groundnut leaves. *Indian Phytopath*, 35(4): 728 ~ 730
- Reddy M N, Rao A S. 1977. Changes in the composition of free and protein amino acids in groundnut leaves induced by infection with *Puccinia arachidis* Speg. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 11(3/4): 167 ~ 172
- Schlosser E W. 1980. Preformed internal chemical defenses. In: Horsfall J G, Cowling E B, eds. *Plant Disease Vol. 5*. New York: Academic Press, 161 ~ 177
- Subrahmayam P, McDonald D, Subba Rao P V. 1983. Influence of host genotype on uredospore production and germinability in *Puccinia arachidis*. *Phytopathology*, 73: 726 ~ 729

DYNAMICS OF SEVERAL BIOCHEMICAL COMPONENTS IN PEANUT PLANTS AFTER RUST INFECTION AND THEIR RELATIONSHIPS TO DISEASE RESISTANCE

Li Dun Wang Zhenzhong Lin Kongxun*

(Dept. of Plant Protection, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

By investigating several biochemical components in five peanut (*Arachis hypogaea* Linn.) cultivars with different levels of resistance to rust fungus (*Puccinia arachidis*) before and after infection, an experiment was conducted to analyze the dynamic process of such components and their relationships to disease resistance. In healthy plant, the content of soluble sugars was generally higher in susceptible cultivars than that in resistant ones, and after infection, the content in infected plants was lower than that in healthy ones. Such results shows that peanut rust was a kind of "high sugar disease". The ratio of protein contents in the diseased plants to those in the healthy ones was found to be always high (>1) in the rather resistant cultivars and low (<1) in the rather susceptible ones. At the 12th hour after infection it was very apparent that the more susceptible cultivar the lower ratio, which was also increased to over 1 only in the later stage of the disease infection. Some newly formed amino acids, cysteine and tyrosine, were observed in the early stage of infection and then

disappeared. These two amino acids were reported to be linked with the resistance of plant to the attack by fungi and bacteria. The contents of several amino acids, expressed as the same ratio mentioned above, were found to decrease to less than 1 at the 12th hour after disease infection, of which some were demonstrated to be related to disease resistance, the more susceptible cultivar the lower ratio. Among these amino acids, leucine, isoleucine, histidine and alanine were sensitive to the fungus infection.

Key words *Puccinia arachidis*; *Arachis hypogaea*; biochemical components; nucleic acids; amino acids; protein; disease resistance

* Lin Kung-hsun