

# 花生体内几种酶的活性与 抗锈病性的关系

李 盾\*      王振中      林孔勋

(植保系)

**摘要** 在锈菌侵染前和侵染后的若干阶段测定了具有不同程度抗性的5个花生品种中的苯丙氨酸解氨酶(PAL), 过氧化物酶(PO), 多酚氧化酶(PPO)活性, 并分析其与抗性的关系。结果表明, PAL是一种诱导酶, 在测定的大多数时间内, 呈现酶活性越大, 抗性越强的趋势; 在侵染后的12, 24和48h, 大多数品种病叶的PO活性高于健叶, 基本上是品种愈感病酶活性变化愈大; 在健康叶片中, PPO的活性变化与抗锈病性显著相关, 但在受锈菌侵染的叶片组织中, PPO的活性变化似与抗性无明显相关。

**关键词** 花生; 花生锈病; 苯丙氨酸解氨酶; 过氧化物酶; 多酚氧化酶

花生锈病(*Puccinia arachidis* Speg.)是中国华南地区对花生生产危害较大的病害之一, 每年都造成很大的损失<sup>[5,6]</sup>。此病在世界上许多花生产区也经常普遍发生<sup>[5,10,18,19]</sup>。在花生锈病的分布, 病原菌生物学特性, 发生发展规律, 防治以及品种抗病性生理等方面都有不少报导<sup>[1,5,13,18]</sup>。对花生抗性生理的研究表明, 花生受锈菌侵染后, 其体内的氧化酶活性会发生变化<sup>[14]</sup>。但是, 这些报导只是指出花生感病后体内某些氧化酶活性的变化, 而有关这些变化与抗病性关系的研究却很少。

Subrahmanyam<sup>[21]</sup>在花生不同品种对锈菌侵染影响的分析中发现: 无论在抗病或感病品种中, 夏孢子均能萌发且从气孔侵入寄主体内, 其进入率与寄主抗性无关, 病菌在寄主体内的扩展则明显受到寄主抗性的抑制, 因而推测花生品种的抗病性主要由生理抗性来控制的, 似与植物的形态结构没有很大关系。Cook<sup>[12]</sup>也曾明确指出, 花生抗锈病性主要是由生理抗性控制的。因此, 对具有不同抗性梯度的花生品种的有关酶的活性进行测定, 分析其与抗性的关系, 无论在实践或理论上, 都具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物

供试的花生品种(*Arachis hypogaea* Linn.)为粤油39(感病级数: 0.5级); 汕油27(1.5~2级); 粤油223(2.5~3级); 粤油551-116(3.5~4级); 粤油187-93(4~4.5)等5个不同抗性梯度的品种(以下分别简称GO39, SO27, GO223, GO551-116和GO187-93)。品种的感病等级表示品种的田间抗性, 0级为无病, 5级为全株叶片均发病。

\* 1989年届毕业硕士研究生, 现在广东省微生物研究所工作。

1990-03-16收稿

上述品种花生在室内盆栽种植,每次5盆,每盆5株,盛花期进行接种测试。

### 1.2 供试菌源和接种方法

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病田,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,制成孢子悬浮液,用小喷雾器喷雾接种。孢子悬浮液的浓度为:在 $10\times 16$ 倍显微镜下每视野30~60个孢子。

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24h,室温为 $22\sim 32^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.3 取样方法

分别从五个品种植株的不同叶位的复叶上取样,分别于接种前12h,接种后12, 24, 48, 96h和显症(约276h)各取一次,不接种的植株以相同方法取健康叶片作为对照。

### 1.4 几种酶活性的测定

分别称取不同抗性品种各处理的花生叶片2g进行下述酶的活性测定,使用的测定仪器为日本岛津uv-120-02分光光度计。

1.4.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定 PAL的提取和活性测定以及酶活单位的表示按王敬文和薛应龙<sup>[2]</sup>的方法进行。

蛋白质测定按Bradford<sup>[9]</sup>的考马斯亮蓝G-250方法进行。

1.4.2 多酚氧化酶(PPO)活性的测定 多酚氧化酶的提取,活性测定以及酶活单位的表示基本上按Anosike和Ojimelukwe<sup>[7]</sup>的方法,测定系统由0.02 mol/L邻苯二酚液1.5 ml,酶提取液0.2 ml,0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH6.8)2 ml组成。

1.4.3 过氧化物酶(PO)活性的测定

过氧化物酶的提取和测定以及酶活性的表示方法按叶钟音和刘经芬<sup>[4]</sup>的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活性的动态变化

2.1.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL) 受锈菌侵染的花生植株可测到PAL活性,但在对照和接种前均测不到,说明花生锈菌的侵染可诱导寄主PAL活性的提高。

花生受侵染后,可测到两个酶活峰。除GO551-116外其余4个品种的第一个酶活峰在侵染后36h出现,而GO551-116在12h出现。第二酶活峰则在276h(显症)出现。除第二个峰外,在侵染后的12,36,60,108h的测定结果基本上显示出品种抗性愈强,酶活性愈高的规

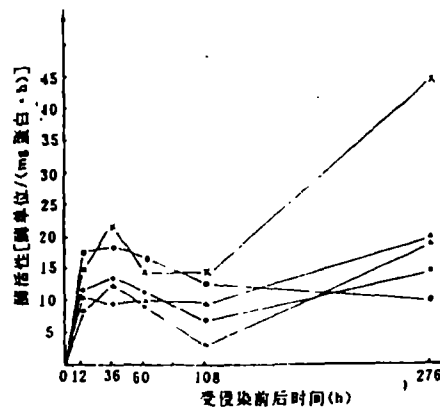


图1 花生受锈菌侵染前后PAL活性的变化曲线  
 ×: GO39 ○: SO27 ●: GO223  
 △: GO551-116 ▲: GO187-93  
 0表示侵染前,12表示侵染后12h,余类推。  
 酶单位:每小时在290nm处OD值增加0.01为一个酶单位。

律(图1)。

2.1.2 过氧化物酶(PO) 花生受锈菌侵染后12, 24, 48 h, 大多数品种病叶的PO活性高于对照健株上的健叶, 尤以感病品种的酶活性提高较为明显, 基本上是品种愈感病, 酶活变化值越大。但显症时(约276 h)5个品种的PO活性都比健叶低, 尤以抗病品种下降最明显(表1)。Ekbote和Mayee<sup>[14]</sup>也曾发现, 受锈菌侵染的花生感病品种PO活性明显增强, 抗病品种变化不大, 我们的试验结果与这基本一致。

表1 花生受锈菌侵染前后PO活性的病/健值的变化

病/健值** / 品种	时间* (h)	-12	12	24	48	96	276
GO39		1.000	0.916	0.897	0.896	0.773	0.542
SO27		1.000	0.774	1.028	1.205	1.012	0.884
GO223		1.000	1.156	1.631	1.637	1.243	0.792
GO551-116		1.000	0.932	1.645	0.969	0.780	0.884
GO187-93		1.000	1.625	1.437	1.621	1.055	0.925

\* -12表示侵染前12 h, 12表示侵染后12 h, 余类推。

\*\*表示5个品种在健株上的健叶酶活性与病株上的病叶酶活性之比值。

2.1.3 多酚氧化酶(PPO) 花生受锈菌侵染后, 高感品种(GO187-93)和高抗品种中(GO39)的PPO活性始终高于对照健叶, 变化幅度较大, 中抗品种(GO223)中的酶活性在大多数情况下比对照健叶略低, 变化较平稳, 感病品种(GO551-116)和抗病品种(SO27)与健叶对比则时高时低(表2)。这种变化与抗病性之间似无直接的相关性。

表2 花生受锈菌侵染前后PPO活性的病/健值的变化

病/健值** / 品种	时间* (h)	-12	12	24	48	96	276
GO39		1.000	0.984	1.392	1.075	1.764	1.272
SO27		1.000	1.098	1.002	0.844	1.345	0.917
GO223		1.000	0.959	0.850	0.978	1.039	0.809
GO551-116		1.000	1.191	1.502	0.971	0.739	0.811
GO187-93		1.000	1.497	1.914	1.194	1.208	1.241

\*\*\*同表1。

## 2.2 酶活性与抗病性的相关分析

2.2.1 花生健株健叶酶活性与抗病性的相关性 健康花生植株叶片中的PPO活性变化(表3)在多次的测定中显示与抗病性有较高的相关性, 在四次测定中, PPO的活性

变化与抗病性的相关系数 (R) 分别是 0.925 7, 0.742 3, 0.752 1 和 0.801 2。而过氧化物酶的活性变化与抗病性的相关则不显著。

表 3 花生健株健叶 PPO 活性的变化

品种	测定次数			
	1	2	3	4
GO39	9.83	26.29	21.90	16.20
SO27	6.94	11.53	12.81	6.45
GO223	6.05	13.52	17.17	5.71
GO551-116	6.23	14.90	14.95	6.36
GO187-93	5.01	10.67	10.36	5.66

\* 酶活单位为每分钟引起吸光率改变 0.001 所需的酶量。

2.2.2 花生受锈菌侵染后 PAL 活性变化与抗病性的相关性 对感病花生叶片 PAL 活性变化(参考图 1)与抗病性相关分析表明:侵染后 36 和 108 h,酶活性变化与抗病性的相关性达到显著水平( $R > 0.878 3$ );在侵染后 12 和 60 h,相关系数也较高( $R \geq 0.80$ )。显然,PAL 的活性变化可作为花生抗病性的一个重要生化指标。

2.2.3 花生 PO,PPO 活性的病/健比值的变化与抗病性的相关性 过氧化物酶活性病/健值变化与抗性相关分析表明:侵染后 24 和 276 h 酶活性的病/健比值与抗性有较大的相关性,相关系数(R)分别是 -0.834 1 和 -0.825 1(表 1)。而多酚氧化酶活性的病/健比值与抗病性的相关不显著。

### 3 结论与讨论

PAL 是一种诱导酶,可被光、损伤、病原物侵染、激素等多种因素的诱导<sup>[15]</sup>。我们的试验结果证明了,花生锈菌的侵染可诱导植株体内的 PAL,且在侵染 36 h 出现第一个酶活峰,可以想象,这是锈菌侵染后诱发寄主以提高 PAL 活性为枢纽的防御反应,从而抑制病菌在寄主中的扩展,第二个峰在显症时出现,这则可能是由于病原物的生长和繁殖已造成寄主细胞的破坏而刺激了寄主 PAL 活性的提高。

各品种的 PO 活性大体上呈现侵染初期比健叶上升,后期下降的变化趋势。PPO 活性变化的趋势则因不同品种而异,高感品种和高抗品种变化幅度较大,波动较多,感病品种和抗病品种次之,变化最平稳的是中抗品种。

苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶、多酚氧化酶的活性与花生抗病性有一定的关系。实际上,这几种酶在有关抗性的研究中被认为是与抗病性反应有关的酶<sup>[8,14,16]</sup>,尽管其确切的机制还不甚清楚。

花生叶片 PAL 的活性与品种抗病性呈较高的正相关。前人的研究也曾发现,马铃薯受晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 侵染后,体内 PAL 活性明显提高,且抗病品种提高

幅度较感病品种大<sup>[3,16]</sup>。由于植物体内的酚类物质有抗微生物的特性,而大多数酚类物质都是由莽草酸途径合成,PAL是此途径的关键酶<sup>[11,17]</sup>,因而,PAL活性愈大,酚类合成代谢愈强,品种的抗病性也就愈高,这与花生叶片上PAL活性与抗性关系的分析结果是相符的。

植物感病后,PO活性往往提高,感病品种的PO活性比抗病品种高<sup>[14,20]</sup>。我们的试验结果也表明:在侵染后的24和276h,PO活性的病/健比值与抗病性有较高的负相关。

在健叶中PPO的活性与品种抗病性有显著的相关关系,在锈菌侵染的组织中,其活性虽有一定的变化,且与抗性仍有一定的关系,但相关系数未达显著水平。Ekbote和Mayee<sup>[14]</sup>的研究指出,花生感病品种在显症前PPO活性明显增强,抗病品种则变化不大,这一结论似乎与我们的研究结果不尽相同。但从本文的结果来看(表2),受锈菌侵染后高感品种GO187-93的PPO活性有明显增加,且这种增加一直保持到显症期,而相对抗病的品种GO223,PPO活性则仅有小幅度的下降或上升趋势,如果仅从这两个品种来分析,是与Ekbote和Mayee的研究结果相同,不过,从本研究具有抗性级差(从高抗→高感)的5个品种的结果来看,这种变化与品种抗性则无显著的相关关系。

#### 参 考 文 献

- 1 广东省农科院植保所花生组.花生锈病侵染源及病菌生物学特性的研究.广东农业科学,1974(2):40~44
- 2 王敬文,薛应龙.植物苯丙氨酸解氨酶的研究.1.植物激素对甘薯块根苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸4-羟化酶活性变化及其伴随性的影响.植物生理学报,1981,7(4):373~380
- 3 王敬文,薛应龙.植物苯丙氨酸解氨酶的研究.1.苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫中的作用.植物生理学报,1982,8:35~43
- 4 叶钟音,刘经芬.水稻对白叶枯病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)的抗性与过氧化物酶和过氧化物酶同工酶活性的关系.南京农学院学报,1984(2):39~45
- 5 林孔勋,郑仲.敌锈钠(对氨基苯磺酸钠)的研究1.敌锈钠与胶体硫混用在田间防治花生锈病和叶斑病的效果.华南农学院学报,1980,1(2):73~85
- 6 周亮高等.广东省花生锈病的研究.植物保护学报,1980,7(2):67~73
- 7 Anosike E O and Ojmeluke P C. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from cocoyam, *Xanthosoma sagittifolium*. Journal of Experimental Botany, 1982, 33: 487~494
- 8 Bell A A. Biochemical mechanisms of disease resistance. Ann Rev Plant Physiol, 1981, 32: 21~81
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Annal Biochem, 1976, 72: 248~254
- 10 Bromfield K R. Peanut rust: a review of literature. Journal American Peanut Research and Education Association, Inc, 1971, 3(1): 111~121
- 11 Gamm E L and Towers G H N. Review article phenylalanine ammonia lyase. Phytochemistry, 1973, 12: 961~973
- 12 Cook M. Screening of peanut for resistance to peanut rust in the greenhouse and field. Pl Dis Rept, 1972, 56(5): 382~386
- 13 Ekbote A U and Mayee C D. Biochemical changes in rust (*Puccinia arachidis*) resistant and susceptible

- varieties of groundnut after inoculation. *Indian Phytopath*, 1983, 36(1): 194
- 14 Ekbote A U and Mayee C D. Biochemical changes due to rust in resistant and susceptible groundnuts. I. Changes in oxidative enzymes. *Indian Journal of Plant Pathology*, 1984, 2(1): 21~26
  - 15 Forsyth F R and Samborski D J. 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*, 1958, 36: 717~723
  - 16 Friend J, et al. Phenylalanine ammonia lyase, chorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Pl Pathol*, 1973, 3(4): 495~507
  - 17 Kosuge T. The role of phenolics in host response to infection. *Ann Rev Phytopathol*, 1969, 7: 195~222
  - 18 Mallaiah K V and Rao A S. Groundnut rust: Factors influencing disease development, sporulation and germination of urediospores. *Indian Phytopath*, 1979, 32: 382~388
  - 19 Mundhe P N and Mayee C D. Effect of temperature on incubation period of three isolates of *Puccinia arachidis*. *Research Bulletin of Marathwada Agric Univ*, 1979, 3: 62
  - 20 Stavely J R and Hanson E W. Electrophoretic comparisons of resistant and susceptible *Trifolium pratense* noninoculated and inoculated with *Erysiphe polygoni*. *Phytopathology*, 1967, 57: 482~485
  - 21 Subrahmanyam P, et al. Influence of host genotype on urediospore production and germinability in *Puccinia arachidis*. *Phytopathology*, 1983, 73: 726~729

## RELATIONSHIPS BETWEEN ACTIVITY OF SEVERAL ENZYMES AND PEANUT RESISTANCE TO RUST

Li Dun      Wang Zhenzhong      Lin Kung--hsun

(Department of Plant Protection)

**Abstract** At several stages before and after infection by rust fungus (*Puccinia arachidis*), analysis was made of the activities of several enzymes, including phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (PO) and polyphenoloxidase (PPO), in five cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* Linn.) with different levels of resistance, and their relationships to resistance. PAL was an induced enzyme, whose activity could only be observed after infection, and was found to be positively related to resistance. The level of PO activity in infected plants was higher than that in healthy ones in most cultivars at 12, 24, and 48 hours after infection, the more susceptible the cultivar, the more its change in infected plants. PPO activity in healthy plants was significantly related to resistance of the cultivars, but no relationship was found between its activity and resistance in infected tissues.

**Key words** *Arachis hypogaea* Linn.; *Puccinia arachidis*; phenylalanine ammonia lyase; peroxidase; polyphenoloxidase