

草酸对黄瓜叶片中几种与抗病有关酶的系统诱导作用^{*}

张宗申¹ 彭新湘¹ 姜子德² 李明启¹

(1 华南农业大学生物技术学院, 广州 510642; 2 华南农业大学资源环境学院)

摘要 试验用盆栽黄瓜为材料, 研究了草酸对黄瓜叶片中几种与抗病有关的酶的系统诱导作用. 结果表明: 0.04 mol/L 的草酸诱导几丁质酶总活性的效果最好; 草酸和圆刺盘孢菌在 1~7 d 内可诱导几丁质酶活性持续提高, 第 7 d 挑战接种后活性继续上升; 草酸和圆刺盘孢菌诱导内切几丁质酶活性提高的倍数显著大于外切几丁质酶; 在 1~11 d 内, 草酸对苯丙氨酸解氨酶的诱导效果不明显, 而圆刺盘孢菌诱导该酶活性从第 4 d 开始上升; 草酸和圆刺盘孢菌对黄瓜叶内过氧化氢酶活性的诱导作用, 在前 6 d 表现抑制作用, 然后酶活性恢复到对照水平.

关键词 草酸; 圆刺盘孢菌; 几丁质酶; 过氧化氢酶; 苯丙氨酸解氨酶; 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)
中图分类号 S 43

人们通过系统研究发现, 不但生物因子能诱导植物抗病, 而且一些体外无杀菌作用的化学物质也具有这种能力. 当植物受到上述因子作用后, 体内发生一系列生理生化反应, 或产生许多新的物质, 甚至某些物质发生结构上的变化, 致使植物在不同程度上增加了对病原物的抵抗能力(张元恩, 1989).

近几年来, 国内外均有报告认为草酸是一种非常有效的非生物诱抗剂, 草酸喷施黄瓜不但对多种真菌病害产生系统抗性, 而且还可诱导对细菌和病毒病害的抗性(张元恩等, 1992; Mucharromah, 1991). 本试验研究了草酸对黄瓜体内几种与抗病有关的酶的系统诱导作用, 探讨了草酸的诱抗机理.

1 材料与方法

1.1 供试品种

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种: 夏青 2 号, 用质量分数为 1%氯化汞消毒种子, 于 25℃ 下保温催芽, 然后土培盆栽.

1.2 接种方法

用体积分数为 10%的黄瓜叶煎汁制备孢子悬浮液, 孢子浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^9$ 个/mL. 用点滴法接种孢子悬浮液. 每叶 12 滴, 每滴 15 μ L, 保湿 48 h, 温度为 25~26℃.

1.3 草酸施用

用 KOH 调节草酸溶液的 pH 至 6.2. 待第二片真叶充分展开时, 以涂抹的方式处理第一片真叶, 以湿润为准. 取未经诱导处理的第二片真叶, 洗净、晾干后称重.

1.4 酶活性测定

1.4.1 几丁质酶活性测定 测定材料用乙酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 5.0)研磨, 11 500 g 离心 10 min, 取上清液按 Boller(1983)的方法测定酶活力. 酶活性单位(U): 在测定条件下, O. D 值每分钟增加 0.01 所需的酶量.

1.4.2 苯丙氨酸解氨酶活性测定 测定材料用硼酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 8.8, 内含 0.005 mol/L 巯基乙醇)研磨, 13 400 g 离心 10 min, 取上清液按 Hyodo(1971)的方法测定酶活性. 酶活性单位(U): 在测定条件下, O. D₂₉₀值每分钟增加 0.001 所需的酶量.

1.4.3 过氧化氢酶活性测定 测定材料用乙酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.0)研磨, 15 300 g 离心 10 min, 取上清液按 Chance(1955)的方法测定酶活性. 酶活性单位(U): 在测定条件下, 每分钟 O. D 值每分钟下降 0.001 所需的酶量.

2 结果

2.1 草酸诱导黄瓜叶片中几丁质酶的浓度效应

用 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 的草酸处理黄瓜幼苗的第一片真叶, 对照用水处理, 隔 3 d 后取第二片真叶样本测定几丁质酶的活性, 结果(图 1)表明在 0.01 ~ 0.04 mol/L 范围内, 酶活性随着草酸浓度增加而变大, 至 0.04 mol/L 时达到最大.

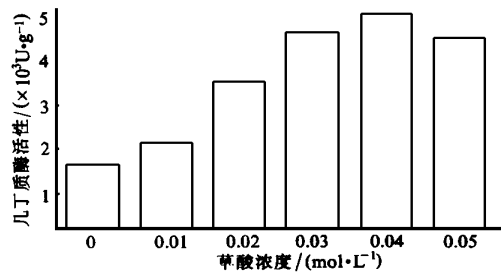


图 1 不同草酸浓度诱导几丁质酶的效果

2.2 草酸诱导几丁质酶的时间效应

根据以上的浓度效应试验, 我们选取了效果最佳的 0.04 mol/L 浓度草酸处理黄瓜幼苗, 在处理第 7 d 进行挑战接种. 在不同时间取样测定几丁质酶活性变化. 结果(图 2)表明, 在初始阶段(1~7 d), 处理的叶片内酶活性持续上升, 对照则保持不变, 挑战接种后处理和对照均上升.

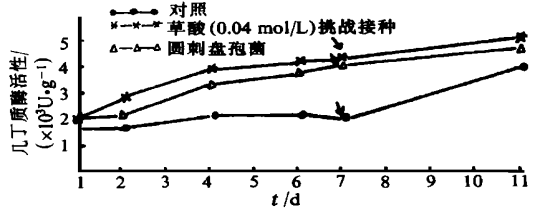


图 2 草酸和圆刺盘孢菌及挑战接种对几丁质酶的诱导作用

黄瓜叶中的几丁质酶活性较低, 通过草酸的诱导可以提高 2~3 倍. 内切几丁质酶和外切几丁质酶升高有差异. 数据表 1 表明内切酶提高的百分率高于外切酶. 结果还表明, 黄瓜体内几丁质酶活性中, 内切酶含量较低, 通过诱导可以提高.

表 1 草酸和圆刺盘孢菌诱导内切和外切几丁质酶的效果¹⁾

| 处理 | 总活力/ (U·g ⁻¹) | 内切酶活力 | | 外切酶活力 | |
|-------|------------------------------|-----------------------------|-----|-----------------------------|-----|
| | | 活力/ (U·g ⁻¹) | 比率 | 活力/ (U·g ⁻¹) | 比率 |
| 对 照 | 1 080 | 300 | 100 | 780 | 100 |
| 草 酸 | 2 820 | 880 | 293 | 1 940 | 249 |
| 圆刺盘孢菌 | 2 200 | 680 | 226 | 1 250 | 195 |

1) 活力以鲜重测定

2.3 草酸对苯丙氨酸解氨酶(PAL)的诱导效果

用40 mmol/L 草酸和圆刺盘孢菌处理黄瓜第一片真叶, 定期取第二片真叶测定PAL 的活性变化. 结果(图3)表明, 草酸不能诱导PAL 活性上升, 而圆刺盘孢菌可显著诱导PAL 活性, 至第6 d后可提高1倍以上.

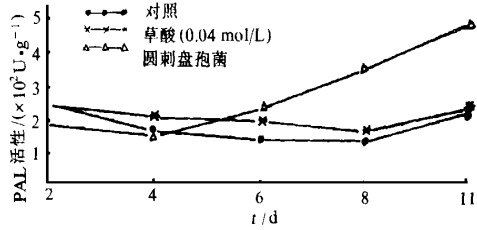


图3 草酸和圆刺盘孢菌对 PAL 活性的诱导作用

2.4 草酸对黄瓜叶中过氧化氢酶的诱导效果

用0.04 mol/L 草酸和圆刺盘孢菌处理第一片真叶, 在不同时间取样测定酶活性. 结果(图4)表明, 在2~6 d的时间范围内, 草酸对黄瓜叶内的过氧化氢酶活性具有抑制作用, 以后恢复到对照水平, 用圆刺盘孢菌挑战接种后酶活性变化不大. 并且还观察到第3、4 d的活性比2 d时提高, 第6 d时又恢复至2 d时的水平. 我们认为这可能是叶片在生长过程中酶蛋白合成和分解的变化而引起的酶含量的变化.

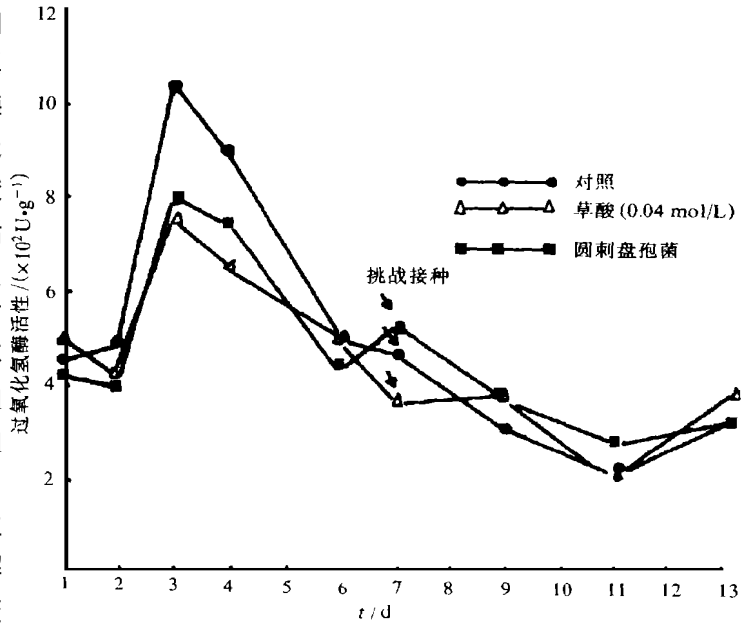


图4 草酸和圆刺盘孢菌对过氧化氢酶活性的影响

3 讨论

几丁质酶广泛存在于高等植物, 作用于许多病原菌细胞壁的主要成分—几丁质, 但在植物中还未发现该底物(张世明, 1989). 正常情况下, 该酶只有低水平的组成型表达, 当用诱导因子处理后, 酶活性迅速增强(Metraux et al, 1986). 因此它被看作是植物抗真菌病的潜在抗性机制.

草酸能诱导黄瓜苗内几丁质酶活性提高, 这可能是它能诱导黄瓜抗圆刺盘孢菌的一个重要因素. 结果(表1)表明, 草酸对内切几丁质酶的诱导倍数高于外切几丁质酶. 内切几丁质酶的抗菌效果更好, 因为真菌菌丝端部生长点的几丁质都是新生态型, 对内切几丁质酶较敏感(杜良成等, 1992; Albeles et al, 1970; Boller, 1983). 但是, 这种酶被诱导后能否维持在较高水平, 这对于诱抗效果是一个重要的影响因素.

苯丙氨酸解氨酶是植物次生代谢中的关键酶,催化 L-苯丙氨酸生成反式肉桂酸,该产物是一些植保素成分的前体物质(Jane et al, 1961)。它受病原菌、损伤、光等因子诱导合成(Haga et al, 1988)。植物抗病的许多功能物质的产生与该酶关系密切。因此,通过外界因子诱导该酶活性提高也是增强植物抗病能力的一个重要途径。我们的试验结果(图 3)表明,在测定时间内,草酸对该酶无诱导效果,而圆刺盘孢菌却能显著诱导其活性。这可能是因为草酸和圆刺盘孢菌对黄瓜具有不同的作用方式,或是苯丙氨酸解氨酶具有不同于其它酶的诱导途径。这个结果说明了草酸不是通过诱导该酶活性提高的途径增强黄瓜抗圆刺盘孢菌的能力,也可能说明植物抗病途径潜在能力的多样性。

用草酸和圆刺盘孢菌处理黄瓜叶片后,对过氧化氢酶活性首先表现一定的抑制作用,但很快恢复到对照水平。已有报告(Chen, 1993)认为过氧化氢酶在诱抗信号传导中起着重要作用。当用水杨酸处理烟草叶片后,过氧化氢酶活性受到抑制,导致 H_2O_2 的大量积累而启动了一系列的抗病反应(Jones, 1994)。因此草酸对过氧化氢酶的抑制作用是否和水杨酸的作用机制一致,有待于进一步研究。

草酸之所以能诱导几种酶活性的变化,这可能与它在植物内的代谢有关。草酸在植物内通过酶的作用可以生成 H_2O_2 (Pundie, 1984), 国外也有报道表明草酸本身在生物体内可以诱发自由基的产生(Evans et al, 1994)。因此认为草酸可能是诱导了自由基的增加,进而引起一系列的抗性反应。

参 考 文 献

- 杜良成, 王 钧. 1992. 稻瘟菌诱导的水稻几丁质酶, β -1, 3-葡聚糖酶活性及分布. 植物生理学报, 18(1): 29~36
- 张元恩. 1989. 诱导黄瓜系统抗病性研究. 北京农业大学学报, 15(1): 65~67
- 张元恩, 刘英慧. 1992. 非杀菌剂化合物防治瓜类病害的研究. 植物病理学报, 22(3): 241~244
- 张世明. 1989. 高等植物几丁质酶研究进展. 植物生理学通讯, 25(1): 8~13
- Albeles F B, Bosshart R P, Forrench L E, et al. 1970. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol*, 47(1): 129~134
- Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. 1983. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta*, 157(1): 22~31
- Chance B, Maehly A C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. In: Colowick S P, Kaplan N O, eds. *Methods in Enzymol*. New York: Academic Press. 764~775
- Chen Z, Silva H, Klessig D F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262(5141): 1883~1886
- Evans C S, Dutton M V, Guillen F, et al. 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 235~240
- Haga M, Haruyama T, Kano H, et al. 1988. Dependence on ethylene of the induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in rice leaf infected with blast fungus. *Agric Biol Chem*, 52(4): 943~950
- Hyodo H, Yang S F., 1971. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. *Plant Physiol*, 48(6): 765~769
- Jane K, Koukol J, Conn E E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J Biol Chem*, 236(10): 2692~2698
- Jones A M. 1994. Surprising signals in plant cells. *Science*, 263(5144): 183~184

- Mettraux J P, Boller T. 1986. Local systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral bacterial and fungal infections. *Physiol Mol Plant Pathol*, 28(1): 161 ~ 169
- Mucharromah E, Kuc J. 1991. Oxalate and phosphate induce systemic resistance against disease caused by fungi bacteria and viruses in cucumber. *Crop Protection*, 10(4): 265 ~ 270
- Pundie C S, Nath L. 1984. Occurrence of an oxalate oxidase in Sorghum leaves. *Phytochem*, 23(9): 1871 ~ 1874

SYSTEMIC INDUCTION OF SEVERAL PATHOGEN-RESISTANCE-RELATED ENZYMES BY OXALATE IN CUCUMBER (*Cucumis sativus*) LEAVES

Zhang Zongshen¹ Peng Xinxiang¹ Jiang Zide² Li Mingqi¹

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Dept. of Plant Protection, South China Agric. Univ.)

Abstract

The systemic induction of several pathogen—resistance—related enzymes by oxalate and the pathogen was investigated in cucumber leaves. The results showed that in the range of 0.01 ~ 0.04 mol/L, the induction degree of chitinase activity by oxalate was increased with the increasing concentration, attaining maximum at 0.04 mol/L. As the concentration was over 0.04 mol/L, the effectiveness started declining. During 1 to 7 days chitinase activity was increasingly induced by oxalate and *C. orbicular* and when it was followed by challenging inoculation at the seventh day on the second true leaf, the activity kept increasing, and more endo—chitinase activity was induced than exo—chitinase by both oxalate and *C. orbiculare*. PAL activity could not be induced by oxalate while *C. orbiculare* was able to induce it. In contrast, CAT activity was reduced by oxalate and *C. orbiculare* during the first 6 days after treatment, then recovered to original and control level in later stage.

Key words oxalate; *C. orbiculare*; chitinase; catalase; phenylalanine ammonia-Lyase; *Cucumis sativus* L.