

# 叶霉菌粗毒素对番茄幼苗防御酶及活性氧的诱导

刘慧芹<sup>1</sup>, 刘慧平<sup>2</sup>, 韩巨才<sup>2</sup>

(1. 天津农学院 园艺系, 天津 300384; 2. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

**摘要:**以番茄不同抗性品种的幼苗为材料, 采用浸渍法研究了低浓度的叶霉菌粗毒素对番茄叶片防御酶(SOD、POD、PAL)活性及活性氧( $O_2^-$ 和 $H_2O_2$ )的诱导作用, 为探讨病菌毒素诱导植物抗病性的生理生化机制提供科学依据。结果表明, 番茄经叶霉菌粗毒素诱导后, 抗、感品种叶片的SOD活性下降, 但抗病品种的下降比率小, 且比感病品种具有较高的酶活性; 抗、感品种的POD活性变化趋势均为先上升后下降, 二者间的酶活性变化差异不大; 抗、感品种PAL活性均升高, 但抗病品种增加更快, 且增加比率高于感病品种; 抗、感品种的 $O_2^-$ 产率和 $H_2O_2$ 含量的变化呈增加趋势, 抗病品种的增加比率均高于感病品种, 且增加峰值出现早。说明叶霉菌粗毒素诱导的番茄体内防御酶和活性氧变化与番茄抗叶霉病有着密切的关系。

**关键词:** 叶霉菌; 粗毒素; 防御酶; 活性氧; 诱导抗病性

中图分类号: S436.412.19 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)06-0215-04

## Induce of Crude Toxin from *Cladosporium fulvum* on Defense Enzyme and Activity Oxygen of Tomato Seedlings

LIU Hui-qin<sup>1</sup>, LIU Hui-ping<sup>2</sup>, HAN Ju-cai<sup>2</sup>

(1. Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. Agronomy College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** The inducement of crude toxin from *Cladosporium fulvum* on defense enzyme (SOD, POD, PAL) and activity ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) was studied in leaves of different tomato varieties by soaking method. The studies provided scientific basis on plant physiological and biochemical resistance mechanisms induced by pathogen-toxin. The results showed that superoxide dismutase (SOD) activity of all varieties descended, but the resistant variety had lower declining ratio and higher enzyme activity than that of the susceptible one. Changes of peroxidase (POD) activity in two varieties were similar. POD activity increased at first, followed by a decline, but two varieties had a little diversity in activity change. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity increased in two varieties, but PAL activity in the resistant variety increased fast, and increasing ratio was higher than that in susceptible one. Production rate of superoxide anion ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content increased. Increasing ratio in resistant variety was higher than that in susceptible one. The activity in the resistant variety appeared earlier than that in the susceptible one. Changes of defense enzyme and activity oxygen induced by toxin from *Cladosporium fulvum* in tomato seedlings were closely related to their resistance.

**Key words:** *Cladosporium fulvum*; Crude toxin; Defense enzyme; Activity oxygen; Induced resistance to diseases

诱导抗病性(获得抗病性)是植物经各种生物预先接种后或受到物化因子处理后产生的抗病性。这些诱导因子又称为激发子, 由于激发子的作用引起寄主植物发生一系列生化变化, 从而导致植物多种防卫反应的发生。生物源的激发子是一类能诱导寄

主植物产生防卫反应的特殊化合物, 从病原真菌中已发现许多蛋白质或糖蛋白等具有激发子活性<sup>[1,2]</sup>。现在利用生物源激发子诱导植物抗病性成为植物病害生物防治研究的热点<sup>[3]</sup>。在寄主植物与病原物互作中, 防御酶与活性氧的变化又与植物抗

收稿日期: 2009-09-22

基金项目: 山西省留学归国基金项目(2009043; 2007061); 山西省科技攻关项目(2007031039)

作者简介: 刘慧芹(1973-), 女, 山西太原人, 讲师, 硕士, 主要从事生物病理学研究。

通讯作者: 刘慧平(1956-), 女, 山西榆次人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事生物农药学研究。

病性有着密切的关系<sup>[4-6]</sup>。

番茄叶霉病是由真菌黄枝孢 (*Cladosporium fulvum* Cooke) 引发的一种重要病害。近年来, 它已成为保护地番茄生产上最严重的病害之一。叶霉病的发生和危害与其病原菌产生的毒素有一定的相关性, 此毒素能产生多组分的糖蛋白, 诱导寄主叶片黄化、坏死<sup>[7,8]</sup>。从该菌的培养液可以分离到能诱导番茄产生过敏性坏死的糖蛋白激发子<sup>[9]</sup>, 从该菌的体外培养液中可分离到无专化性的激发子<sup>[1]</sup>。本研究以 *C. fulvum* 的粗毒素培养液作为激发子, 研究了在其作用下番茄体内 SOD、POD、PAL 活性及  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  变化, 为探讨 *C. fulvum* 与番茄之间的分子互作奠定基础, 为研究病菌毒素对植物诱导的生理生化抗病机制提供理论基础和科学依据。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

供试番茄品种有抗病品种中杂 8 号、感病品种 823 番茄。番茄叶霉病菌 (*C. fulvum*) 采自山西太谷县保护地番茄的发病植株。

## 1.2 方法

1.2.1 粗毒素提取液制备 病菌经常规方法纯化后, 接种到 PDA 培养基上, 25℃ 下培养 7 d, 用打孔器取 5 块 = 8 mm 的菌块, 接到 250 mL 液体培养基中, 置于 25℃ 培养箱中振荡培养 20 d, 4 层纱布过滤, 在 5 000 r/min 下离心 15 min, 上清液为粗毒素原液。通过对 *C. fulvum* 粗毒素生物活性测定<sup>[10]</sup>, 选用低浓度粗毒素液(稀释 10 倍)作为处理。

1.2.2 幼苗处理 采用幼苗浸渍法, 取 5~6 叶期的幼苗, 洗净根部, 放入盛有 300 mL 粗毒素处理液的烧杯中, 置室温下。在粗毒素处理后 0~5 d 内取样测定生理生化指标, 重复 3 次, 设蒸馏水浸苗为对照。

1.2.3 生理生化指标测定 SOD、POD、PAL 活性采用高俊凤<sup>[11]</sup>方法测定,  $O_2^-$  含量根据王爱国、罗广华<sup>[12]</sup>方法测定,  $H_2O_2$  含量采用 Patterson 等<sup>[13]</sup>的方法测定。

# 2 结果与分析

## 2.1 SOD 活性变化

经毒素诱导后, 番茄叶部 SOD 活性变化如图 1。诱导后 0~1 d, 抗、感品种 SOD 活性变化不大; 2 d 时, 感病品种的 SOD 活性下降到最低, 且下降的比率达到最大(45.4%); 3 d 时, 抗病品种的酶活性下降到最低, 与对照相比, 5 d 时下降比率达到最大(29.2%)。从整个变化趋势上看, 两个品种的 SOD

活性均呈下降趋势, 但抗病品种下降的晚, 下降比率小, 具有相对较高的酶活性。说明抗病性的高低不仅与被诱导的 SOD 活性大小有关, 而且和酶活性变化的早晚有关。

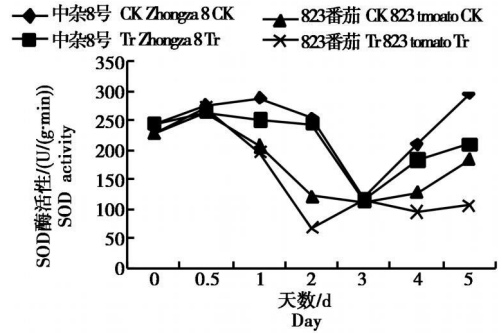


图 1 毒素诱导后不同番茄品种 SOD 活性动态变化  
Fig. 1 Dynamic changes of SOD activities in different tomato varieties induced by toxin

## 2.2 POD 活性的变化

经毒素诱导后, 番茄叶部 POD 活性变化如图 2。0.5 d 时, 经毒素处理的抗病品种 POD 活性上升, 感病品种则趋于下降, 但相对于各自的对照, 均有较大幅度的增加, 增加比率分别为 65.2% 和 65.8%; 1 d 时, 两个品种的 POD 活性始终为处理低于对照, 且一直持续到第 5 天, 不论抗病品种还是感病品种, 与对照相比 POD 活性变化是先升高后下降, 总体趋势为下降, 从变化的平均水平上看, 抗性品种降低了 9.8%, 感病品种降低了 12.3%。两个品种之间的 POD 活性变化相似, 差异不大。

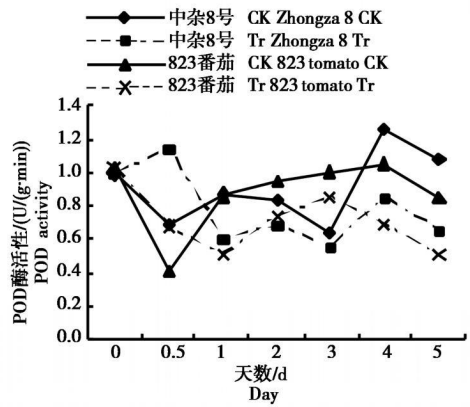


图 2 毒素诱导后不同番茄品种 POD 活性动态变化  
Fig. 2 Dynamic changes of POD activities in different tomato varieties induced by toxin

## 2.3 PAL 活性变化

经毒素诱导后, 番茄叶部 PAL 活性变化如图 3。在 0.5 d 时, 抗、感品种的 PAL 活性, 处理都明显高于对照, 比率分别为 44.9% 和 87.5%, 形成第 1 个相对增长峰值。1~2 d 时 PAL 继续增加, 但速度有所减缓。3 d 时, 抗、感品种的 PAL 活性与对照比, 处理又显著升高, 形成第 2 个增长峰值, 酶活性相对

增幅分别为 115.8% 和 76.8%，此时抗病品种的酶活性也升至最高。从总体水平上看，PAL 活性变化是增加的，抗病品种的 PAL 活性高于感病品种，而且增加幅度也明显高于感病品种。可见毒素诱导能提高 PAL 活性，且抗病品种增加的比率更大。

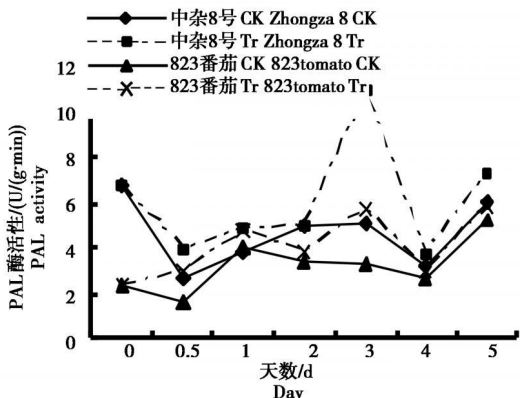


图3 毒素诱导后不同番茄品种 PAL 酶活性动态变化  
Fig.3 Dynamic changes of PAL activity in different tomato varieties induced by toxin

## 2.4 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率的变化

毒素诱导后，番茄叶部 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率与对照相比的增减比率变化如图 4。毒素处理后 0.5 d 时，抗、感品种的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率明显增加。抗病品种的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率除在 3 d 时有所下降(即为负值)外，其余均升高(为正值)，并在 0.5, 5 d 时形成 2 个增长高峰，增加比率分别为 65.0%，63.1%。感病品种的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率与对照相比只在 1 d 时稍有下降，其余均升高，3, 5 d 时也形成 2 个高峰，增加比率分别为 62.4%，57.9%，形成时间晚于抗病品种。说明毒素诱导可使番茄 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率明显增加。

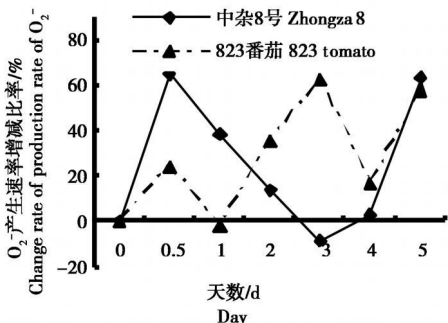


图4 毒素诱导后不同番茄品种中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率增减比率  
Fig.4 Change rate of production rate of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in different tomato varieties induced by toxin

## 2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的变化

毒素诱导后，番茄叶部 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量与对照相比的增减比率变化见图 5。0.5 d 时，抗、感品种的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量都增加，但抗病品种的增加比率明显高于感病品种(分别为 36.3% 和 6.69%)。2 d 内，抗病品种的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增长比率一直高于感病品种，并在 0.5

d 和 2 d 时形成 2 个峰值(36.34%，55.01%)，之后增长速度减缓；而感病品种的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增长比率只在第 3 天时出现一个峰值(34.47%)，小于抗病品种的 2 个峰值。抗病品种的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增长明显高于感病品种的，且峰值产生时间早。毒素诱导可使番茄 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增加。

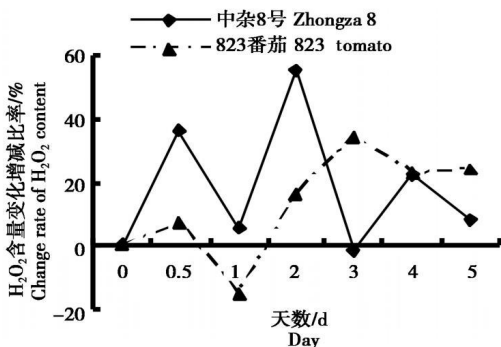


图5 毒素诱导后不同番茄品种中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增减比率  
Fig.5 Change rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in different tomato varieties induced by toxin

## 3 讨论

SOD、POD 是植物体内存在的清除活性氧自由基的重要酶，其活性高低能反映出植物体内自由基清除或抗氧化能力的强弱，可作为植物抗逆性的指标。本试验中，抗、感品种间 SOD 活性的变化有比较明显的差异，抗病品种 SOD 活性降低的比率小于感病品种，且下降时间也晚于感病品种，在诱导前后抗病品种均比感病品种具有较高的酶活性，说明抗病品种清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的能力高于感病品种，具有较好的自我保护能力。毒素处理后，抗、感品种 POD 活性迅速被激活，有利于早期的自我保护。但随着处理时间延长，POD 活性被抑制，但抗、感品种之间的差异不大。总体而言，经粗毒素诱导后，抗、感品种的 SOD、POD 活性下降，这与梁建根等<sup>[14]</sup> 和李海莲等<sup>[15]</sup> 的研究结果相反，他们认为促生菌 CH1 和棉花黄萎毒素可诱导植物 SOD、POD 活性上升。这可能是由于毒素作用番茄后，叶片内活性氧快速增加，为消除过量活性氧带来的伤害，在一定程度上消耗了酶活，使其活性降低。总之，叶霉菌粗毒素处理有利于植物细胞快速积累适量的活性氧，从而激发寄主抗性机制的表达。

在高等植物的次生代谢中，苯丙氨酸解氨酶(PAL)和苯丙烷类代谢途径有关的一些物质与植物的抗病性有密切的关系。经毒素诱导后，番茄叶部 PAL 活性增加，出现 2 次高峰，抗病品种 PAL 活性高于感病品种，增加比率也明显高于感病品种，表明番

茄中 PAL 酶活性越高, 则抗病性越高, PAL 酶活性与番茄品种抗叶霉病强弱呈正相关。这与叶霉菌接种番茄后, PAL 酶活性与番茄抗叶霉病呈正相关的结论一致<sup>[16]</sup>。此外, 梁建根等<sup>[14]</sup>、潘哲超等<sup>[17]</sup>的研究也分别表明了毒素和促生菌激发后的 PAL 酶活性与多种植物的抗病性呈正相关。

植物对病原真菌、细菌等病原物的抗性通常依赖于植物在病原侵染早期能否识别病原, 引起活性氧爆发, 从而启动防卫反应<sup>[18]</sup>; 而且有可能作为第二信使调控抗病相关基因的表达, 并启动植物抗毒素合成基因的转录, 引起过敏性细胞死亡<sup>[19]</sup>, 这为  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  参与植物过敏反应和信号传导奠定了基础。本试验表明, 经毒素诱导后,  $O_2^-$  产率增加, 其中抗病品种的产量大, 产生速度快, 表明抗病品种对毒素刺激更敏感, 能较早、较快的产生  $O_2^-$ ; 抗病品种  $H_2O_2$  的产生明显早于感病品种, 而且出现两次高峰, 感病品种只出现一次, 且迟于抗病品种两次高峰出现的时间, 小于抗病品种的峰值。总之, 毒素诱导了番茄叶片内的  $O_2^-$  产率和  $H_2O_2$  含量的增加, 且抗病品种表现更敏感。表明抗病品种体内酶促防御系统激活所需的时间早于感病品种, 能尽快的接受病菌侵染信号并迅速传递, 产生氧爆发, 及时启动防卫反应, 减少伤害。叶霉菌毒素诱导后, 番茄叶片中的防御酶和活性氧系统发生了明显的变化, 这在一定程度上反映了毒素的诱导作用机制和品种抗病性的生理生化机制。

# 参考文献:

- [1] 王金生. 分子植物病理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] Smith C J. Biochemistry and molecular biology of plant pathology interaction [M]. Oxford: Clarendon Press, 1991: 255 – 270.
- [3] Heil M, Bostock R M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences [J]. Annals of Botany, 2002, 89: 503– 512.
- [4] 张树生, 胡 蕾, 刘忠良, 等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系 [J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48 – 49.

- [5] 邱金龙, 王 钧, 余明珍. 活性氧与植物抗病反应 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 56– 63.
- [6] Ingeborg T, Christiane L, Alok K S. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in Plants [J]. The Plant J, 2003, 34(3): 363– 368.
- [7] Lazarovits G, Higgins V J. Biological activity and specificity of a toxin produced by *Cladosporium fulvum* [J]. Physiology and Biochemistry, 1979, 69(10): 1056– 1061.
- [8] Peever T L, Higgins V J. Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum* [J]. Plant Physiol, 1989, 90: 867– 875.
- [9] De Wit P J, Laug R, Hon e G, et al. Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fulvum* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 71: 137– 141.
- [10] 刘慧芹, 刘慧平, 韩巨才. 叶霉病菌粗毒素对番茄的生物活性测定 [J]. 天津农学院学报, 2004, 11(1): 9– 11.
- [11] 高俊凤. 植物生理学实验技术 [M]. 西安: 世界图书出版社, 2000.
- [12] 王爱国, 罗光华. 植物的超氧自由基与羟反应的定量关系 [J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(6): 55– 57.
- [13] Patterson B D, Mackae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. Anal Biochem, 1984, 39: 487– 492.
- [14] 梁建根, 张炳欣, 陈振宇, 等. 促生菌 CH1 诱导黄瓜对猝倒病抗性的研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 283– 288.
- [15] 李海莲, 侯喜林, 易金鑫, 等. 黄萎病菌粗毒素接种对感病和抗病茄子品种的一些酶类活性和光合特性的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 453– 456.
- [16] 崔彦玲, 张 环. 番茄叶霉病与苯丙氨酸解氨酶的相关性 [J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 79– 82.
- [17] 潘哲超, 陈建斌, 范静华, 等. 稻瘟菌粗毒素对水稻防御性相关酶系的诱导 [J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(2): 162– 166.
- [18] Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection [J]. Biochem J, 1997, 322(3): 681– 692.
- [19] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1997, 48: 251– 275.