

疫病病菌侵染后辣椒幼苗体内 保护酶活性的变化

毛爱军¹, 王永健¹, 冯兰香², 许 勇¹, 耿三省¹, 曹婉红¹

(1. 北京蔬菜研究中心, 北京 100089; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 疫霉菌侵染后辣椒幼苗叶片和根茎组织中 PPO、POD 和 PAL 活性发生变化。试验表明: 除感病品种根茎部固有的 POD 活性较高以外, 抗(耐)病辣椒品种幼苗叶片的 PPO、POD 和 PAL 及根茎部 PPO 和 PAL 活性高于感病品种。疫霉菌侵染后, 仅根茎部 PPO 活性略有下降, 各辣椒品种幼苗叶片和根茎组织 PPO、POD 和 PAL 均在接种后一度显著高于对照。抗(耐)病辣椒品种幼苗根茎部 PAL 活性接种 4 d 升幅大且早, 抗(耐)病品种体内固有的 PPO、POD 和 PAL 活性高, 在辣椒抗疫霉菌反应中起了重要作用。

关键词: 辣椒疫病; 多酚氧化酶; 过氧化物酶; 苯丙氨酸解氨酶

中图分类号: S601 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2003) 02- 0066- 04

Variation of Polyphenoloxidase, Peroxidase and Phenylalanine Ammonia-lyase in Hot Pepper Seedlings Infected by *Phytophthora capsici* L.

MAO Aijun¹, WANG Yong-jian¹, FENG Lan-xiang²,
XU Yong¹, GENG San-sheng¹, CAO Wan-hong¹

(1. National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100089, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The variation of activities of PPO, POD and PAL were analyzed in leaves and stems/ roots of hot pepper seedlings after inoculated with *Phytophthora capsici* L. Higher constitutive PPO, POD and PAL activities were detected in uninoculated leaves and stems/ roots of the resistant cultivars, except higher constitutive POD activities in uninoculated stems/ roots of the susceptible cultivars. General speaking, the three enzyme activities in leaves and POD in the stems/ roots of all tested cultivar seedlings were significantly higher: the most drastic enzyme reactions and the most enhancement of enzymes are that PPO, POD, PAL activities in the inoculated leaves and POD activities in the inoculated stems/ roots of the high susceptible cultivars. The enhancement of POD activities in the inoculated seedlings and PPO activities in the inoculated leaves of the resistant cultivars were much more than those in the susceptible cultivars, and less than in the high susceptible cultivars. An early and rapid increase of PAL in inoculated stems/ roots of the resistant cultivars were induced at 4 days after the inoculation with the fungi, and higher constitutive PPO, POD and PAL activities in uninoculated leaves and stems/ roots of the resistant cultivars may play an important role in pepper resistance to *Phytophthora capsici* L.

Key words: *Phytophthora capsici* L.; Polyphenoloxidase; Peroxidase; Phenylalanine ammonia-lyase

植物体内多酚氧化酶(PPO)可氧化酚类化合物,形成对病原菌有更强毒性的醌类化合物。过氧

化物酶(POD)是木质素合成的关键酶之一^[1]。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是丙烷类代谢途径的关键酶和限

速酶, 这些酶被认为与抗病反应有着密切关系^[2~4]。有报道说病原菌侵染后, 引起植物体内 PAL、PPO、和 POD 等活性升高^[2~8], 并认为这些酶活性与抗病性成正相关^[9,10], 但亦有相反意见^[11,12]。

辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* L.) 是土传病菌, 其病原菌从根部侵染植株。本研究测定了辣椒抗、感病品种感染前后叶片和根茎部的 PPO、POD 和 PAL 活性值, 分析比较了其变化特点, 以期探明其在辣椒疫病抗性的生化机制中的作用, 为辣椒抗病育种提供生化依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选用对疫霉菌抗性不同的 4 个辣椒品种: 8819 (抗病品种), 351(耐病品种), 72(感病品种), 47(高感品种)。种子经 55℃ 水浸泡过夜, 之后用 10% 磷酸三钠处理 20 min, 清水冲洗干净后撒播。辣椒疫霉菌由北京蔬菜中心提供。接种体在 CA 培养基上 (200 g 胡萝卜榨汁过滤, 加 20 g 琼脂, 定容 1 L) 繁殖, 28℃ 培养 10~15 d, 用湿毛笔镇压菌丝, 光照培养 24~36 h, 光强 2 000 lx。之后用毛笔和蒸馏水刷洗孢子囊, 过滤, 镜检, 稀释到 2.0 个孢子囊/100 倍视野后接种。

1.2 方法

1.2.1 育苗、接种及取样 当幼苗两叶一心时分苗于 6.5 cm×6.5 cm 的营养钵中。常规管理, 辣椒幼苗五叶展平时接种疫霉菌。采用灌根法, 每株接种 5 mL, 设不接种为对照。接种前取一次样, 接种后按不同时期取辣椒苗 6~7 株, 分别对叶片和根茎部两部分进行分析。

1.2.2 多酚氧化酶活性的测定 辣椒苗组织和 0.1 mol/L、pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液以 1:4 在冰浴中匀浆后, 4℃、12.8×10³ r/min 离心 15 min, 上清液为酶液。按照 Mozzetti 等^[2]的方法测定酶活性, 反应液为 2.8 mL pH 6, 50 mmol/L 磷酸缓冲液(内含 0.5 mmol/L 绿原酸)加 200 μL 酶液。反应 2 min 后测 OD₄₁₀, 以 2.8 mL 不含绿原酸的缓冲液加相应酶液作参比, 酶活性以毫克蛋白每分钟光密度增加值 (A₄₁₀min⁻¹·mg⁻¹protein) 表示。

1.2.3 过氧化物酶活性的测定 辣椒苗组织中酶液的提取同上。活性测定参考华东师范大学生物系植物生理教研组主编的《植物生理学实验指导》^[13]

的方法。反应液为 3 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6, 内含 0.056% H₂O₂ 和 0.038% 愈创木酚) 和 50 μL 酶液, 室温反应 2 min 后测 OD₄₇₀, 以水作参比, 酶活性以毫克蛋白每分钟光密度增加值 (A₄₇₀min⁻¹mg⁻¹protein) 表示。

1.2.4 苯丙氨酸解氨酶活性的测定 辣椒苗组织用 0.1 mol/L, pH 8.8 硼酸缓冲液(内含 0.1% 巯基乙醇)在冰浴中匀浆后离心 (4℃, 12.8×10³ r/min 离心 15 min), 取上清液为酶液。根据 Mozzetti^[2] 等的方法测定酶活性, 反应液为 3.3 mL 硼酸缓冲液 (含 10 mmol/L L- 苯丙氨酸) 加 0.1 mL 酶液, 40℃ 下反应 1 h 后, 加 0.6 mL 5 mol/L HCl 终止反应, 测 OD₂₉₀, 以反应时间零作参比。OD₂₉₀变化 0.01 为一个酶单位, 酶活性以毫克蛋白每小时酶单位增加值 (U·h⁻¹·mg⁻¹protein) 表示。

1.2.5 提取液中蛋白浓度的测定 按 Bradford^[14] 的考马斯亮蓝方法进行, 以 BSA 为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 未接种辣椒品种幼苗酶活性的变化

未接种处理, 除幼苗根茎部 POD 活性感病辣椒品种极显著高于抗(耐)病品种外, 其他 2 种酶及叶片中 POD 活性都是抗(耐)病辣椒品种显著或极显著高于感病品种。如表 1、2 所示。

表 1 未接种辣椒品种叶片组织中多酚氧化酶、过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶活性的变化

酶种类	品种	平均酶活性	差异显著性	
			0.05	0.01
PPO 活性 (A ₄₁₀ min ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·protein)	8819	0.41	a	A
	351	0.39	b	B
	72	0.35	d	C
POD 活性 (A ₄₇₀ min ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·protein)	47	0.35	c	C
	8819	7.16	a	A
	351	7.04	a	A
PAL 活性 (U·h ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·protein)	72	7.16	a	A
	47	6.60	b	B
	8819	249.02	b	A
	351	263.68	a	A
	72	161.21	c	C
	47	168.54	c	C

注: 数据为 6 次取样, 样品 3 次重复的平均值(下表同)

表 2 未接种辣椒品种根茎组织中多酚氧化酶、过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶活性的变化

酶种类	品种	平均酶活性	差异显著性	
			0.05	0.01
PPO 活性 ($A_{410} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	8819	4.54	a	A
	351	4.62	a	A
	72	4.12	b	B
	47	4.23	b	B
POD 活性 ($A_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	8819	22.62	c	C
	351	29.40	b	B
	72	27.95	b	B
	47	35.91	a	A
PAL 活性 ($\text{U} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	8819	135.35	a	AB
	351	140.52	a	A
	72	137.64	a	A
	47	122.71	b	B

2.2 侵染后酶活性的变化

2.2.1 多酚氧化酶活性的变化 疫霉菌侵染后, 供试辣椒品种幼苗叶片 PPO 活性发生变化, 抗、感辣椒品种侵染期间叶片组织 PPO 活性都一度出现酶活性高峰, 但不同抗性品种之间酶活性升幅及出现时间不同。高感品种 47 酶活性高峰升幅最大, 酶反应最强烈, 接种后 4 d PPO 活性高于对照 1.8 倍, 抗(耐)病品种 8819 和 351 叶片组织 PPO 酶活性高峰出现早且峰值大于感病品种 72。各辣椒品种根茎组织在 PPO 活性侵染初期 2 d 比对照先有所下降, 后逐渐上升(图 1)。

2.2.2 过氧化物酶活性的变化 疫霉菌侵染 4 d, 供试各辣椒品种幼苗叶片和根茎组织 POD 活性普遍增加, 除高感品种 47 叶片组织 POD 活性接种 6 d 出现酶活性高峰, 随后急剧下降外, 其他各辣椒品种

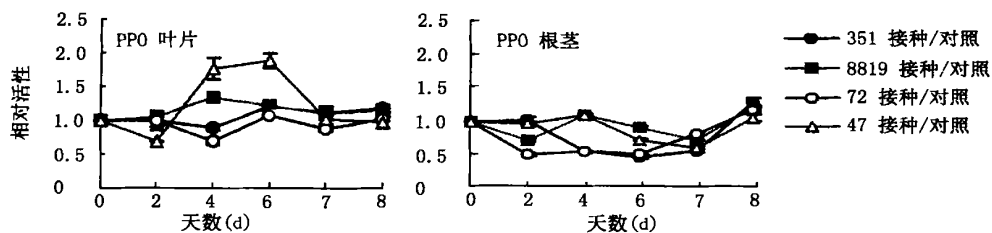


图 1 接种疫霉菌后辣椒苗叶片和根茎部组织中多酚氧化酶活性的变化动态

叶片和根茎组织 POD 活性变化都呈上升趋势, 但抗(耐)病 8819 和 351 次之, 感病品种 72 升幅最小, 抗、感品种上升幅度不同。高感品种 47 升幅最大, (图 2)。

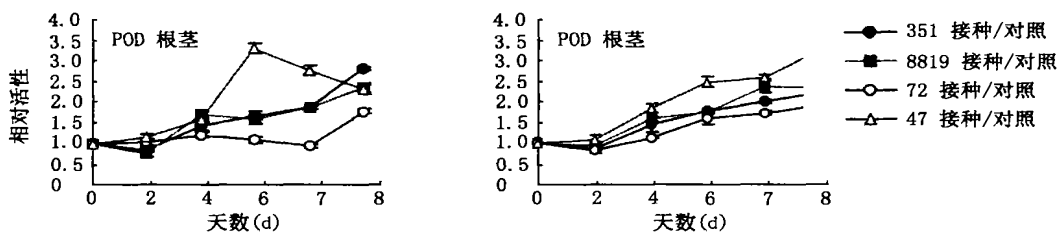


图 2 接种疫霉菌后辣椒苗叶片和根茎部组织中过氧化物酶活性的变化动态

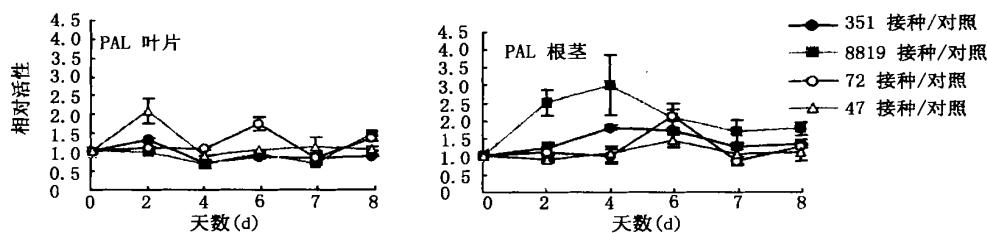


图 3 接种疫霉菌后辣椒苗叶片和根茎部组织中苯丙氨酸解氨酶活性的变化动态

2.2.3 苯丙氨酸解氨酶活性的变化 由图 3 所示, 接种对各辣椒品种叶片和根茎组织中 PAL 活

性变化影响不同。接种后抗病品种叶片组织 PAL 活性变化小, 感病和高感品种叶片 PAL 活性升幅大, 酶活性变化强烈, 分别在接种 2 d 和 6 d 出现明显酶活性高峰。抗(耐)病品种 8819 和 351 根茎组织侵染后 2 d 和 4 d PAL 活性显著高于对照, 酶活性增加幅度大于感病和高感品种, 酶活性高峰早于感病和高感品种 2 d。

3 讨论

本试验研究表明: 抗(耐)病辣椒品种幼苗叶片固有的 PPO、POD 和 PAL 活性及根茎部 PPO 和 PAL 活性高于感病品种。辣椒苗受病原菌侵染后, 除根茎部 PPO 活性先略有下降, 后上升外, 各辣椒品种体内的 PPO、POD 和 PAL 活性普遍升高, 高感辣椒品种幼苗叶片中 PPO、POD、PAL 和根茎部 POD 活性对疫霉菌侵入一度反应最强烈, 酶活性升幅最大, 接种后 4~6 d, 品种 47 根茎和叶片普遍出现明显褐变和萎蔫现象, 这与徐建龙等^[15] 2000 年在细菌性条斑病对水稻的抗病反应及 C. Mozzetti 等^[2] 和常彩涛等^[16] 1995 年报道的辣椒对疫病的抗病反应中 POD 的活性变化结论相似。

抗(耐)病辣椒品种幼苗体内 POD 活性和叶片 PPO 活性升幅尽管小于高感品种, 但却大于感病品种, 与 1995 年 Alcazar 等^[17] 对受疫霉菌侵染的抗、中抗和感病辣椒 3 个品种细胞间 POD 活性测定的结果一致。所以辣椒体内 POD 活性及叶片组织 PPO 和 PAL 活性作为辣椒接种疫霉菌后的一种抗病机制的结果值得讨论。

各辣椒品种幼苗根茎部侵染后 PPO 活性先下降后上升, PPO 活性下降的原因很可能是疫霉菌为土传病菌, 根部侵染早, PPO 活性高峰早的缘故。

综上所述, 抗(耐)病辣椒品种幼苗叶片固有的 PPO、POD 和 PAL 活性及根茎部 PPO 和 PAL 活性高, 及接种后抗病品种根茎部 PAL 活性增幅大而且早, 在辣椒对疫霉菌抗病反应中起了重要作用。

参考文献:

[1] 陈捷. 植物病理生理学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994.

[2] Mozzetti C, Ferraris L, Tamietti G, *et al.* Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different Phytophthora-pepper interactions[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, 46(2): 95-107.

[3] 冯洁, 陈其煥. 棉花体内几种生化物质与抗枯萎病之间的关系的初步研究[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(4): 291-297.

[4] Shiraishi T, Yamada T, Nicholson R L, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* (race 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, 46(2): 153-162.

[5] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 枯萎病菌侵染后棉苗体内多酚氧化酶活性的变化(简报)[J]. *植物生理学通讯*, 1997, 33(3): 175-177.

[6] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 过氧化物酶在棉花对枯萎病抗病性中的作用[J]. *浙江农业大学学报*, 1997, 23(2): 143-148.

[7] Hammerschmidt R, Kuc J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance of cucumber[J]. *Physiol Plant Pathol*, 1982, 20(1): 61-71.

[8] Retig N. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase associated with natural induced resistance of tomato to *Fusarium wilt* [J]. *Physiol Plant Pathol*, 1974, (4): 145-150.

[9] 杨家书, 李舜芳, 吴畏, 等. 小麦品种对白粉病抗病性与过氧化物酶的关系[J]. *植物病理学报*, 1984, 14(4): 235-240.

[10] Yan Wenzhao, Chiu Weifan. Changes of peroxidase activity and isoperoxidases in tomato plants of different resistance infected by tobacco mosaic virus (TMV) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1985, 15(4): 193-198.

[11] Nadolny L, Sequeira L. Increase in peroxidase are not directly involved in induced resistance in tobacco[J]. *Physiol Plant Pathol*, 1980, 16(1): 1-8.

[12] 赵羹梅, 张鹏宴, 蒋小满. 过氧化物酶活性与玉米自交系对丝穗病抗性的关系[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(1): 37-39.

[13] 华东师范大学生物系植物生理教研组. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1985. 143-144.

[14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.

[15] 徐建龙, 童富炎, 胡家恕, 等. 水稻细菌性条斑病抗病性与过氧化物酶同工酶关系的初步研究[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(1): 71-78.

[16] 常彩涛, 王鸣, 巩振辉. 中国蔬菜抗病育种进展[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 533-538.

[17] Alcazar M D, Egea C, Espin A, *et al.* Peroxidase isoenzymes in the defense of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici* [J]. *Physiologia Plantarum*, 1995, 94(4): 736-742.