

# 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相关性

崔彦玲, 张 环

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

**摘要:**以含对叶霉病不同抗性基因的番茄品种为材料,研究了叶霉病菌侵染过程中 PAL 酶活性和次生代谢物木质素含量的变化与品种抗性、病原菌生理小种间的相互关系。接种后苯丙氨酸解氨酶活性增加,抗病品种的 PAL 酶活性高峰出现早于感病品种。番茄品种的抗病性与其接种后 36 h PAL 酶活性变化百分比呈极显著正相关( $r=0.96^{**}$ )。另外,还成功地利用 PAL 酶活性变化速度这一指标对叶霉病生理小种的变异进行了生化鉴定。

**关键词:**番茄; 叶霉病; 苯丙氨酸解氨酶; 抗病指标

中图分类号: S641.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0079-04

## Correlation Analyses Between Resistance to *Cladosporium Fulvum* and PAL Activity in Tomato

CUI Yarr ling, ZHANG Huan

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

**Abstract:** Several varieties of tomato with different degrees of resistance to *cladosporium fulvum* were used to study the changes in phenylalanine ammonia lyase(PAL) activity and lignin conten as well as their correlationship with the resistance degree of varieties and pathogeny during inoculation. PAL activity increased through inoculation. PAL peaks appeared earlier in resistant varieties than those in susceptible ones. There was significant varieties correlation between the seedling resistance and the increase of PAL activity during 36 hours after inoculation( $r=0.96^{**}$ ). The changing speed of PAL activity as a resistance index was applied successfully in identifying the differentiation in physiological varieties of *Cladosporium fulvum*.

**Key words:** Tomato; *Cladosporium fulvum*; PAL; Resistance index

番茄叶霉病(*Fubia fulva*(Cooke) Cif.)是保护地栽培的主要病害,研究发现番茄对叶霉病的抗性为单基因控制的质量性状,并把叶霉病菌和番茄植株的相互作用作为典型的 gene-gene 模式加以研究<sup>[1,2]</sup>。1980 年美国的 Rick 博士发表的基因连锁图中记述了 24 个抗叶霉病的基因位点,目前,已被育种学家应用的抗病基因有 9 个以上<sup>[3,4]</sup>。因此是研究病原菌与植物抗病性的好材料。许多研究表明<sup>[5,6]</sup>:植物品种自身的抗病性与苯丙氨酸代谢途径有密切关系,植物受病原菌侵染后,抗病品种的苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性提高比感病品种提高的幅

度大,并能迅速合成与抗病有关的生化物质如生物碱、植物保卫素、木质素等,有效地阻止了病原菌的扩展, PAL 活性可作为植物抗病性的生化指标。

最近,在京郊个别番茄生产地块,发现含 Cf4 基因的高抗品种有丧失其抗性的现象,怀疑在这些地块出现了新的病原菌生理小种。为证实这一推测,也为进一步探讨品种抗性、PAL 酶活性及病原菌生理小种三者之间的关系,本文以含对叶霉病不同抗性基因的番茄品种为材料,研究了叶霉病菌侵染过程中 PAL 酶活性和次生代谢物木质素含量的变化与品种抗性、病原菌生理小种间的相互关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和接种方法

供试的材料为含对叶霉病不同抗性基因的番茄品种,见表1。

表1 供试的番茄品种

品种代号	所含基因	抗性水平
I 83 84	Cf 0	感病
I 83 85	Cf 1	中抗
I 83 86	Cf 2	高感
I 83 88	Cf 3	耐病
I 83 90	Cf 4	高抗
I 83 91	Cf 5	高抗
I 83 92	Cf 9	高抗

将供试的不同品种1片真叶时分苗于10 cm的育苗钵中,每处理20株,顺序排列,3次重复。接种时间选择在4~5叶期,采用叶面喷洒方法接种,菌液浓度为200倍视野下7~8个孢子。用于接种试验的病原菌是由本中心提供的,采用马铃薯培养基上斜面培养增殖,在20~25℃条件下培养14 d。接种后温度控制在15~25℃之间,并用塑料薄膜覆盖以保持湿度,促进发病。并于接种14 d后,参照张环<sup>[3,4]</sup>的5级病情分级标准调查不同品种的发病情况,并计算病情指数。

### 1.2 生化测定分析

病原菌接种后每隔12 h进行取样,分8次测定苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性;每隔24 h进行取样,分6次测定了木质素含量的变化。苯丙氨酸解氨酶的测定是将1 g叶片加入4 mL提取缓冲液(含Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mmol/L, 巯基乙醇 7 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, 甘油 5%, pH值 8.8),在冰浴中研磨匀浆,于4℃、4 000 r/min条件下离心20 min,上清液用于酶活性的分析。测定方法参照薛应龙<sup>[7]</sup>,以每小时在290 nm处吸收变化0.01所需的酶量为一个单位(U)(相当于每毫升反应混合物形成1 μg肉桂酸)。木质素含量参照植物生化物质分析方法进行测定<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同抗病品种接种前后苯丙氨酸解氨酶活性的变化

采用表1的材料,试验接种后每隔12 h取样测定苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性(表2),测定结果方

差分析表明:接种12 h,抗、感品种的PAL酶活性均无明显变化,12 h后酶活性开始升高,除高感品种I 83-86外,其他品种均在接种后24 h有极显著的变化。说明PAL酶的合成和植物对病原菌的抗性反应需要一定的时间。无论是抗病品种,还是感病品种,在受到病原菌侵染后,都会引起PAL酶活性的提高,只是抗病、感病品种之间酶活性的变化速度不同,3个抗病品种I 83-90, I 83-91和I 83-92具有相同的变化趋势,3个感病品种I 83-86, I 83-84, I 83-88也具有相同的变化趋势。以高抗、中抗、感病的代表性品种I 83-90, I 83-85, I 83-86的PAL酶活性变化数据作图(图1),可以明显看到:高抗品种I 83-90在接种后36~48 h酶活性迅速达到高峰,尔后开始下降;高感品种I 83-84的PAL酶活性变化迟缓,其活性持续上升,接种72 h才达到酶活性高峰;而中抗品种I 83-85的PAL变化介于高抗品种和高感品种之间,酶活性升高速度较慢,但变化持续时间长,84 h后,其酶活性也接近高抗品种的最大值。由此看来,品种的抗病性强弱与接种后PAL酶活性变化峰值的关系不大,而与酶活性变化速度的相关十分密切。

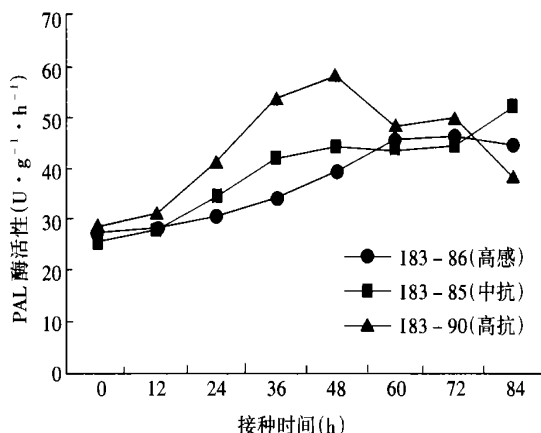


图1 不同抗性品种接种后苯丙氨酸解氨酶活性的变化

将不同品种在接种36 h后其体内PAL活性提高值占原活性(接种前)的百分比进行计算(表2),抗病品种I 83-90, I 83-91和I 83-92之间酶活性变化的百分比没有明显差异,3个感病品种I 83-86, I 83-84, I 83-88之间酶活性变化也没有明显差异;但高抗品种、中抗品种、感病品种三类品种之间的差异均达到极显著水平,说明品种的抗病能力是与酶活性升高速度快慢是一致的。

为进一步分析品种间的抗性与PAL的关系,将具有不同抗病性的6个番茄品种2次接种实验的

表 2 不同抗性品种接种前后苯丙氨酸解氨酶活性的变化

U·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>

品种	接种时间(h)								接种后 36 h 提高(%)
	0	12	24	36	48	60	72	80	
I 83-86(高感)	27.99a	28.00a	31.20a	34.36b	39.35c	46.40d	46.93d	45.19d	22.9a
I 83-84(感病)	27.45a	30.93a	32.48b	35.81c	36.40c	42.45d	46.93e	45.19e	30.2a
I 83-88(耐病)	24.73a	23.23a	27.44b	33.52c	38.40d	44.50e	38.40d	42.50e	35.6a
I 83-85(中抗)	25.60a	28.24a	34.67b	42.40cd	44.27d	39.22c	44.97d	52.80e	65.6b
I 83-90(高抗)	28.95a	30.77a	41.60b	53.87c	58.67d	48.16e	52.31c	38.81b	85.9c
I 83-91(高抗)	31.20a	32.00a	44.97b	59.67c	53.33cd	52.28d	56.53c	48.48b	91.4c
I 83-92(高抗)	27.44a	30.33a	42.96b	54.37c	50.98c	54.93c	45.94b	34.40a	98.5c

注: 不同字母为差异达到 0.01 极显著水平

表 3 接种 36 h 苯丙氨酸解氨酶活性变化百分比与对应品种病情指数间的关系

项目	重复 I						重复 II					
	I 83-84	I 83-86	I 83-85	I 83-90	I 83-91	I 83-92	I 83-84	I 83-86	I 83-85	I 83-90	I 83-91	I 83-92
酶活性 变化*(%)	33.15	23.86	78.00	83.74	91.43	100.80	30.18	22.90	65.63	85.86	91.35	98.54
病情指数	88.80	98.00	43.20	0	0	0	85.60	94.30	32.00	0	0	0

注: \* 为接种后 36 h 的酶活性比接种前提高的百分数

PAL 酶活性测定结果综合在一起, 以接种后其病情指数( Y)对 PAL 酶活性变化的百分比(X)进行回归分析(表 3)所得到的回归方程为: Y= 115.98-1.23X, 相关系数 r= -0.96, 经显著性测定, 病情指数与对应植株体内 PAL 酶活性变化百分比呈极显著的负相关。这进一步证明: 番茄品种的抗病性与其接种后体内 PAL 酶活性变化强度呈正相关。

2.2 病原菌生理小种的变化引起 PAL 酶活性的变化

近几年育成的双抗 2 号、佳粉 15 等抗叶霉病优良一代杂种对叶霉病的抗性是达到免疫水平的, 但最近在京郊个别番茄生产地块, 发现含 Cf4 基因的高抗品种有丧失其抗性的现象。由于叶霉病菌和番茄植株的相互作用为典型的 gene gene 模式, 即抗病基因对病原菌生理小种的抗性存在专一性, 因此我们怀疑在这些地块有新的病原菌生理小种产生。为证实这一推测, 也为进一步研究品种抗性、PAL 酶活性及病原菌生理小种三者之间的关系, 以含 Cf4 的 I 83-90 为材料, 分别接种从这些地块采集的新菌源和原来的菌源, 并对其 PAL 酶活性进行测定(图 2)。结果表明: 含 Cf4 抗叶霉病基因的 I 83-90 接种原来的菌源后, 植株体内的 PAL 酶活性变化比较快, 36 h 酶活性提高近 1 倍, 48 h 后酶活性开始下降, 其表现与图 1 高抗品种的变化趋势相一致; 而 I 83-90 接种

新菌源后, 植株体内的 PAL 酶活性变化较为缓慢, 且其活性持续上升, 这一变化趋势已明显不同于前者, 并与图 1 中 I 83-86 感病品种的变化曲线相似, 说明新采的两种病原菌对品种 I 83-90 的作用与原来的病原菌已不同, 也就是说, 从生化反应上看, 叶霉病菌已分化出新的生理小种。这一结论和后来的病情指数的调查结果是一致的, 从而进一步证明了 PAL 酶与番茄植物抗病性的关系。

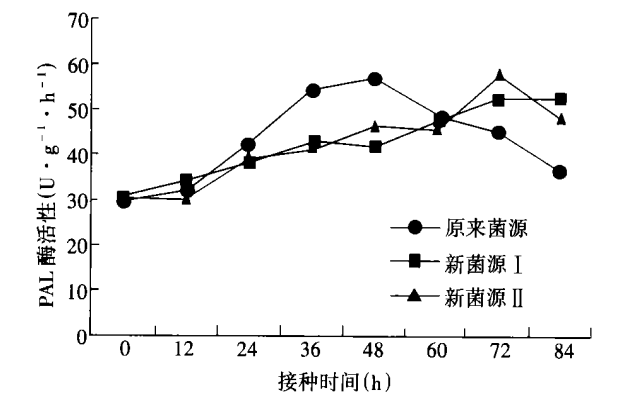


图 2 接种不同病原菌生理小种后苯丙氨酸解氨酶活性的变化

2.3 不同抗病品种接种前后木质素含量的变化

采用具有不同抗病性的 6 个番茄品种为材料, 接种后每隔 24 h 取样测定木质素的含量(表 4), 3 个感病品种 I 83-86, I 83-84, I 83-88 具有相同的变

只是略高于接种前的含量水平;而抗病品种 I 83-90 和 I 83-91 在接种后 24~48 h,木质素含量开始大量提高,在 4~5 d 内木质素含量提高了 1~2 倍;而中抗品种 I 83-85 的木质素含量变化介于高抗品种和高感品种之间。由此看来,番茄品种的抗病性与其接种后体内木质素的合成数量呈正相关,这也同番茄抗病性 PAL 酶相关关系是一致的。

表 4 不同抗性品种接种后叶片内木质素含量的变化 %

品种	接种时间(h)					
	0	24	48	72	96	120
I 83-86(高感)	0.69	0.71	0.80	0.77	0.87	0.89
I 83-84(感病)	0.59	0.58	0.63	0.65	0.72	0.76
I 83-88(耐病)	0.87	0.87	0.91	1.04	1.02	1.02
I 83-85(中抗)	0.57	0.64	0.83	1.05	1.23	1.19
I 83-90(高抗)	0.53	0.69	1.05	1.33	1.49	1.58
I 83-91(高抗)	0.79	0.90	1.17	1.27	1.43	1.29

### 3 讨论

苯丙氨酸类代谢是生成多种次生物质的主要途径之一,其中许多和此代谢有关的次生物质是与植株的抗病性相关的。而苯丙氨酸解氨酶是这一代谢途径的定速酶,直接决定这一代谢途径的强度,并通过代谢的终产物如植保素、木质素等增加的多少表现出不同的抗病性<sup>[5]</sup>。木质素作为 PAL 催化反应的最终产物之一,能牢固地结合到细胞壁上,因不被大多数病原菌分解,成为病原菌入侵的机械屏障。本试验对木质素的测定表明:抗病品种接种叶霉病菌后,其体内大量积累木质素,而感病品种的木质素合成的很少,这与其他作物上得到的结果是一致的。而且还可以看到,木质素的合成与 PAL 酶活性的变化是平行进行的,只是时间上稍有落后,这种酶同其催化产物在时间上前后表达的一致性合乎逻辑的。

本试验对不同抗性的番茄品种接种后 PAL 酶活性的动态分析表明:无论是抗病品种,还是感病品种,在受到病原菌侵染后,其体内的细胞都会作出抗病反应,表现为 PAL 酶活性的提高,但抗病、感病品

种之间反应的快慢不同,抗病品种对病菌的入侵很敏感,接种后酶活性增加很快,迅速达到高峰;感病品种对病菌的入侵反应较为迟钝,PAL 酶活性变化较慢,但其活性变化持续时间长,接种 72~84 h 后酶活性也达到较高水平;而中抗品种的 PAL 变化介于高抗品种和高感品种之间。将抗病、感病品种的 PAL 酶活性峰值比较,可发现它们与品种的抗病性之间并无明显的相关性,这与前人<sup>[5,6]</sup>的研究结果有所不同。而相关分析表明,番茄品种的抗病性与其接种后 36 h PAL 酶活性变化强度呈极显著正相关,这反应出不同抗性的品种,其抗病系统的启动和基因的转录速度不同,而 PAL 酶合成则是抗病基因表达的结果。因此,与其说 PAL 酶活性与抗病性呈正相关,还不如说 PAL 酶活性增加的速度与其抗病性呈正相关。另外,本文还成功地利用 PAL 酶活性变化速度这一指标对叶霉病生理小种的变异进行了生化鉴定。因此,苯丙氨酸解氨酶活性的变化速度可作为品种抗叶霉病的生化指标。

### 参考文献:

- [1] P J G M DE WIT. Specific proteins in the apoplast of *cladosporium fulvum* infected tomato leaves [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1986, 29: 159-172.
- [2] P J G M DE WIT, F E C A N D E R M E E R. Accumulation of the pathogenesis related tomato leaf protein P14 as an early indicator of incompatibility in the interaction between *cladosporium fulvum* and tomato [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1986, 28: 203-214.
- [3] 张 环. 北京主要菜区番茄叶霉病菌寄生性分化的初步研究[J]. *北京蔬菜*, 1985, (5): 2-7.
- [4] 张 环. “双抗 2 号”番茄新品种的育成[J]. *中国蔬菜*, 1988, (4): 4-8.
- [5] 王敬文. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究[J]. *植物生理学报*, 1983, 7(4): 373-380.
- [6] 杨家书. 植物苯丙氨酸代谢与小麦对白粉病抗性的关系[J]. *植物病理学报*, 1986, 16(3): 169-173.
- [7] 薛应龙. 植物生理学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982.
- [8] 荆家海, 译. 植物生化物质分析方法[M]. 北京: 北京科学出版社, 1981.