

松针褐斑病菌毒素处理后湿地松组培苗 PAL、PPO、SOD 活性变化研究

程方, 叶建仁*, 刘戈, 安会翠

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037)

摘要:为研究抗松针褐斑病菌在湿地松子代组培苗体内的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性变化与其抗病性的关系,以抗病湿地松瓶内组培苗和温室1年生组培苗针叶为材料,测定PAL、PPO、SOD的活性。结果表明:松针褐斑病菌毒素处理后,湿地松PAL和PPO活性与抗病性成一定正相关关系,SOD活性与植株抗病性在48~168h内表现有一定的负相关性。

关键词:湿地松组培苗;松针褐斑病;苯丙氨酸解氨酶;多酚氧化酶;超氧化物歧化酶

中图分类号:S791.246

文献标识码:A

Study on PAL, PPO, SOD Activities of Tissue Cultured Plantlets of Slash Pine Treated with *Lecanosticta acicola*

CHENG Fang, YE Jian-ren, LIU Ge, AN Hui-cui

(Forest Resources and Environment Institute, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Studying on the relationship between phenylalanine ammonialyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), superoxide dismutase (SOD) activities of tissue cultured plantlets of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) and its disease-resistance, the PAL, PPO and SOD activities of the plantlets cultured in bottles and in greenhouse were measured. The result showed that after the plantlets were treated with brown-spot needle blight toxin, the PAL and PPO activities showed a positive correlation into disease resistance, and the SOD activity showed a certain degree of negative correlation at the 48-168 h.

Key words: tissue cultured plantlet; slash pine; *Pinus elliottii*; brown-spot needle blight; phenylalanine ammonialyase; polyphenol oxidase; superoxide dismutase

松针褐斑病在我国南方普遍发生,严重阻碍了湿地松(*Pinus elliottii* Engelm.)的发展,叶建仁等^[1]从严重感病林分中选择抗病优树,建立了抗病种子园;然而,种子园种子产量有限,该研究小组又以湿地松成熟胚、离体胚无菌苗、无菌实生苗等为外植体,成功地建立了湿地松器官发生的组织培养再生体系,且获得的试管苗移植成活^[2-3],并对其子代组培苗进行了抗病性测定^[4]。病原菌的致病性与植物

的抗病性是生物界一种十分复杂的相互作用系统,当植物受到病原菌侵染后,植物体内会发生包含着形态、生理、生化和分子生物学等一系列的变化过程^[5],与苯丙烷类代谢途径和活性氧代谢途径相关的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)3种酶均可能参与了松针褐斑病的发展过程,并在植株抗病性中起着重要的作用。相关研究表明:湿地松针叶用松针褐斑病菌毒素液

处理后,多酚氧化酶活力表现下降趋势,抗病株的降幅比易感株大^[6],而无论是抗病针叶还是易感针叶,苯丙氨酸解氨酶的活性在用毒素处理后无明显变化^[7]。当植物受到环境胁迫时,膜系统会受到破坏,导致电导率增加,为了降低危害,SOD 和过氧化物酶(POD)的活性也有较大幅度增加,以缓解逆境胁迫对膜系统的伤害^[8]。本研究用松针褐斑病菌毒素液处理湿地松子代瓶内组培苗和温室 1 年生组培苗针叶,测定 PAL、PPO、SOD 的活性,旨在了解这几种酶对湿地松组培苗是否具有同样的作用,这将有助于对抗病湿地松组培苗的抗病机理作深入了解。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

南京林业大学抗病育种实验室继代培养 18 代且长势均匀的湿地松瓶内组培苗 32#3、8#11、8#2、8#40、普通组培苗,用松针褐斑病菌毒素处理后抗病性强弱为 8#40 > 8#2 > 8#11 > 32#3 > 普通组培苗^[4];温室 1 年生湿地松组培苗 32#3、32#7、普通组培苗针叶,抗松针褐斑病由强到弱依次为 32#7、32#3、1 年生普通组培苗^[4]。

1.2 松针褐斑病菌的培养及其毒素液的制备

1.2.1 松针褐斑病菌的培养 松针褐斑病菌由南京林业大学森林病理研究组提供,将其活化培养在 PDA 平板培养基上,恒温 25 ℃ 下培养,16 ~ 20 d 转接至新的 PDA 平板培养基,直至有足够数量的松针褐斑病菌为止。

1.2.2 松针褐斑病菌毒素液的制备

1.2.2.1 小麦培养基的制作 称取纯净干燥的生小麦粒 30 g,装入 250 mL 三角瓶中,加入 0.6 g 蔗糖,加水浸没小麦粒,高压灭菌 20 min。

1.2.2.2 接种 将 PDA 平板培养基上培养 16 ~ 20 d 的松针褐斑病菌转接到小麦培养基中,并充分混匀。

1.2.2.3 培养 恒温 25 ℃ 下培养 1 个月,可见小麦粒上布满黑色的分生孢子座。

1.2.2.4 毒素原液的制备 在三角瓶中加入无菌水至浸没小麦培养基,充分摇匀后静置 10 h,先用双层滤纸抽真空过滤,然后用旋转蒸发器在 60 ℃ 下抽真空蒸发浓缩至 3/5 原体积后,即为毒素原液,将该毒素原液高温、高压灭菌 15 min 后备用。

1.3 松针褐斑病菌毒素处理瓶内组培苗

将灭菌后的毒素原液在无菌条件下倒入 DCR

培养基表面,约 0.5 cm。选取室内代数和长势均一致的抗性组培苗 32#3、8#11、8#2、8#40、普通组培苗,切掉基部愈伤后转入含毒素的培养基中,每处理 3 个重复,每个重复 10 株苗。以培养基表面含不接菌的小麦浸提液转接普通组培苗为对照。

1.4 针叶松针褐斑病菌毒素处理温室组培苗

将灭菌后的毒素原液分装在 250 mL 三角瓶中,约 1 cm,选取健康的 1 年生抗性组培苗 32#3、32#7、1 年生普通组培苗针叶插入三角瓶中,每处理 3 个重复,每重复 15 根针叶。以不接菌的小麦浸提液接种普通组培苗针叶为对照。

1.5 经松针褐斑病菌毒素处理后湿地松体内 PAL、PPO、SOD 活性测定

对 1.3、1.4 节处理的材料在处理 0、6、12、24、48、96、168 h 时均匀采集瓶内组培苗各部位的针叶和温室组培苗的针叶,各处理 3 个重复,各重复间取样部位基本保持一致,测定植株体内 PAL、PPO、SOD 的活性。

1.5.1 PPO 酶液的提取及酶活性的测定 称取 0.5 g 新鲜样品,剪碎,按 1:10 (w/v) 的比例加入 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液 (pH 值 8.7、含 20 mmol · L⁻¹ 的巯基乙醇) 和少许聚乙烯吡咯烷酮 (PVP),冰浴研磨成匀浆,匀浆在 TGL-16G-A 型冷冻离心机,4 ℃、10 000 r · min⁻¹ 下离心 20 min,上清液即为酶液。

取 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液 (pH 值 8.7、含 120 μmol · L⁻¹ L-苯丙氨酸) 4 mL,加入 0.5 mL 酶液,于 30 ℃ 下准确反应 60 min 后,加入 1 mL 6 mol · L⁻¹ 的 HCl 终止反应,于 7 ℃、10 000 r · min⁻¹ 下离心 15 min,取上清液在 UV755B 型紫外可见分光光度计 290 nm 波长下测定 OD 值;以每小时每克蛋白质 OD 值变化 0.1 为一个酶活力单位。

1.5.2 PAL 酶液的提取及酶活性的测定 PPO 酶液的提取方法同 1.5.1 节 PPO 酶液的提取。

取 50 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 值 5.5) 3.5 mL,1 mL 0.1 mol · L⁻¹ 邻苯二酚和 0.5 mL 酶液,于 37 ℃ 下准确反应 15 min 后,在 UV755B 型的紫外可见分光光度计 525 nm 波长下测定 OD 值,以每分钟每克蛋白质 OD 值变化 0.01 为一个酶活力单位。

1.5.3 SOD 酶液的提取及酶活性的测定 称取 0.5 g 新鲜样品,切碎,放入研钵中,加入 6 mL 50 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 值 7.8),研磨成匀浆,将匀浆全部转入离心管中,混合均匀后置于冰箱中静置 10 min,然后于 10 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,上清液即为酶液。

在 6 mL 反应混合液(含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 值 7.8)3 mL、 $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲硫氨酸(MET) 0.6 mL、 $750 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT 0.6 mL、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 0.6 mL、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素 0.6 mL、蒸馏水 0.5 mL)中加入 0.1 mL 的酶液,以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 值 7.8)代替酶液为最大光化还原管,用蒸馏水做空白管,然后将各管放在 4 000 lx 光照培养箱或日光灯下光照约 20 min 后,在 UV755B 型的紫外可见分光光度计 560 nm 波长下测定 OD 值,以抑制 NBT 光化还原 50% 所需的酶液为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 松针褐斑病菌毒素处理后湿地松体内 PAL 活性的变化

瓶内普通组培苗接种毒素后第 3 天最先开始出现肉眼清晰可见的典型受害症状,针叶上首先出现不连续水渍状段斑,随后是 32#3 出现症状,抗性强的 8#40 最后表现出症状,7 d 后感病严重的组培苗多个段斑相互连接为一体,整个组培苗变褐萎焉^[4]。

温室组培苗针叶接种毒素后,普通组培苗针叶第 2 天发现 3 个典型病斑,而 32#3 组培苗针叶第 3 天才发现 2 个病斑,32#7 第 3 天发现 1 个病斑,病斑均在 1 d 后变成枯斑,4 d 后感病严重的针叶上各病斑连接成一片,整个针叶枯萎^[4]。

结果表明:用松针褐斑病菌毒素处理前,抗性湿地松子代组培苗和普通湿地松子代组培苗 PAL 活性差异不大,毒素处理后 PAL 活性均呈现较规律的动态变化,与抗病性呈一定的正相关关系。由图 1 可以看出:毒素处理前,各无性系的 PAL 活性为 $75.8 \sim 87.6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;毒素处理后,8#40、8#2、8#11 呈上升趋势,至 12 h 达第 1 个峰值,32#3、普通组培苗的 PAL 活性先略微下降,在处理 12 h 时也达第 1 个峰值,之后 PAL 活性下降,至处理 24 h 时 PAL 活性降至第 1 个波谷,除 8#40 外,其它处理的 PAL 活性均低于处理前,8#40 的 PAL 活性却显著高于其他无性系,达 $121.4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,比处理前高出 $40.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;而后 PAL 活性上升,除普通组培苗在处理 48 h 时达第 2 个高峰($104.7 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)外,抗性组培苗均在处理 96 h 时到第 2 个峰值,8#40 的第 2 个峰值比第 1 个峰值高,达 $156.3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;处理 96~168 h 的 PAL 活性均下降,8#40 在 168 h 时, PAL 酶活性显著高于其他无性系,普通组培苗的酶活性最低。PAL 酶是跟抗性

密切相关的酶,8#40 抗性强的酶活性一直处于较高的水平,而普通的组培苗活性低,可能跟体内抑制病原菌物质的积累有关。组培苗未表现出症状的前 48 h 内, PAL 活性都经历了升高降低再升高的过程,当普通组培苗表现出症状后, PAL 活性就一直降低,抗性组培苗的症状表现比普通组培苗的晚,其酶活性的第 2 个峰值也比普通组培苗的滞后,当症状快出现的时候 PAL 活性迅速上升,当症状表现后 PAL 活性一直处于下降趋势。

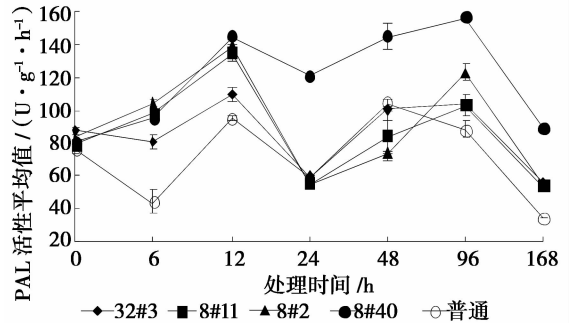


图1 湿地松瓶内组培苗不同无性系用松针褐斑病菌毒素处理后的 PAL 活性变化

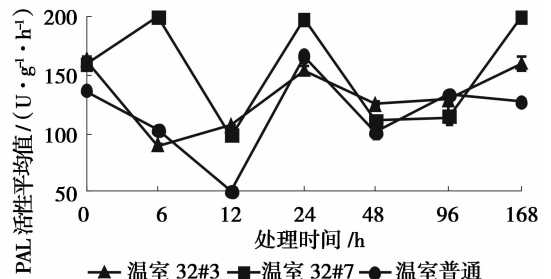


图2 湿地松温室组培苗不同无性系针叶用松针褐斑病菌毒素处理后的 PAL 活性变化

由图 2 可以看出:用毒素处理前后,温室湿地松组培苗针叶各无性系的 PAL 活性变化规律不尽一致,但抗性无性系的 PAL 活性较普通的高。普通组培苗针叶和 32#3 针叶的 PAL 活性先下降,后又上升,在处理 24 h 时达到第 1 个高峰,而 32#7 在处理 24 h 时出现第 2 个高峰;处理 24~48 h,各无性系的 PAL 活性下降;处理 48~96 h,各无性系的 PAL 活性处于平缓上升阶段,到处理 168 h 时,32#7 的 PAL 活性又上升且与普通组培苗针叶和 32#3 针叶的差异显著。

2.2 松针褐斑病菌毒素处理后湿地松体内 PPO 活性的变化

结果表明:在松针褐斑病菌毒素处理后,湿地松组培苗体内的 PPO 活性与病害发展过程有一定的相关性,抗性较强的无性系的 PPO 活性先下降,后

上升,而中抗和普通组培苗的 PPO 活性在毒素处理后波动较小。

由图3可知:用松针褐斑病菌毒素处理前,抗性强的8#40、8#2的PPO活性较高,其余无性系的PPO活性差异不显著;毒素处理后,8#40和8#2的PPO活性先下降,后又上升,在处理12h时达第1个高峰,随后8#40的PPO活性缓慢下降后再缓慢上升,在处理96h时达第2个高峰($44.53 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$);8#2的PPO活性在处理12~24h内迅速下降,处理24~96h内波动不大,处理96~168h内缓慢上升;32#3、8#11、普通组培苗毒素处理后PPO活性变化波动不明显,但是总体水平低于抗性强的8#40和832。

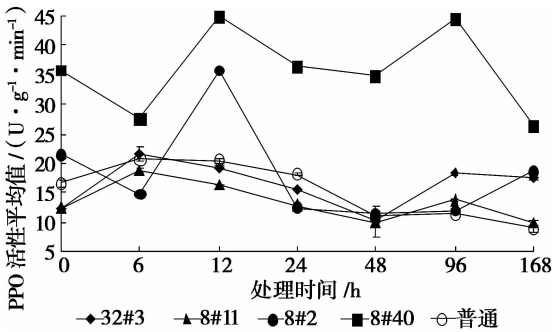


图3 湿地松瓶内组培苗不同无性系针叶用松针褐斑病菌毒素处理后的PPO活性变化

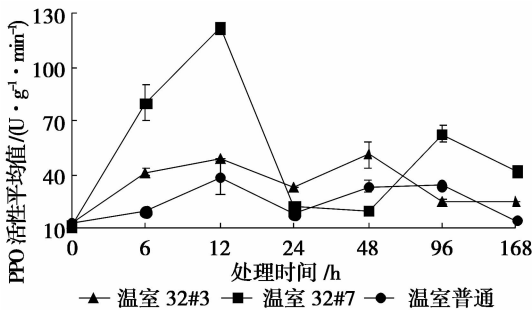


图4 湿地松温室组培苗不同无性系针叶用松针褐斑病菌毒素处理后的PPO活性变化

由图4可知:在毒素处理前,湿地松温室组培苗针叶不同无性系的PPO活性差异不大;毒素处理后,抗病性强的32#7针叶的PPO活性快速上升,于12h达第1个高峰($122 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),比同一时间的普通针叶的PPO活性高出 $83.2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$;处理24~48h内32#7针叶的PPO的活性波动不大,处理96h时达第2个小高峰,处理168h时又下降到 $41.87 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,比同期的32#3针叶、普通组培苗针叶的PPO活性高;32#3针叶和普通组培苗针叶在整个病害发展过程中PPO的活性波动不明显。

2.3 松针褐斑病菌毒素处理后湿地松体内SOD活性的变化

由图5可知:松针褐斑病菌毒素处理前,不同无性系的SOD活性差异较大,但和抗病性没有相关关系;毒素处理后,与普通组培苗相比,抗病组培苗的SOD活性上升迅速,在处理6h时达第1个高峰值,之后迅速下降;而普通组培苗上升缓慢,在处理12h时达第1个小高峰,SOD活性为 $80.36 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$;抗病组培苗在处理12~48h内SOD活性变化平缓,而后急剧上升;普通组培苗在处理12~48h内SOD活性下降速度比抗病组培苗的快,处理48~168h内SOD活性也急剧上升。

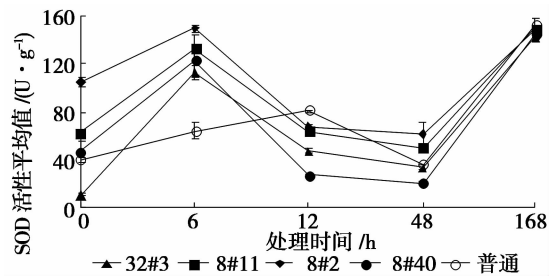


图5 湿地松瓶内组培苗不同无性系针叶用松针褐斑病菌毒素处理后的SOD活性变化

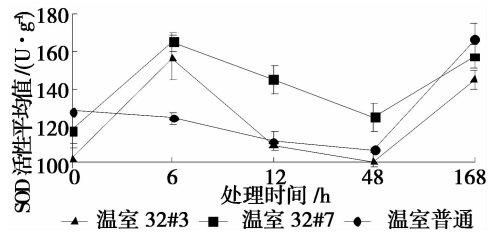


图6 湿地松温室组培苗不同无性系针叶用松针褐斑病菌毒素处理后的SOD活性变化

由图6可知:在毒素处理后,抗病湿地松组培苗针叶的SOD活性迅速上升,在处理6h时出现第1个高峰,之后下降;普通组培苗针叶的SOD活性在毒素处理前比抗病组培苗针叶的高,但毒素处理后一直处于平缓阶段;处理48~168h内各无性系针叶的SOD活性均上升,但差异不显著。这表明,松针褐斑病菌毒素处理后,湿地松体内的SOD活性与湿地松抗病性密切相关,可能是湿地松组培苗在受到松针褐斑病菌毒素侵染后,抗病组培苗内的SOD活性迅速被激活,以清除或阻止病原菌毒素造成的伤害。

3 结论与讨论

(1) 苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,作为苯丙烷类代谢中最重要的酶,其活性与植物抗病性有密切的关系,可作为一个衡

量植物抗病性的生化指标,同时参与了植物抗病次生物质的合成与积累,因而在植物抗病反应中起着重要作用^[9]。本研究表明:松针褐斑病菌毒素处理前,抗性湿地松子代组培苗和普通湿地松子代组培苗的 PAL 活性差异不大;毒素处理后, PAL 活性均呈现出较规律的动态变化,与抗病性呈一定的正相关关系。有报道指出, PAL 活性高峰一般出现在病原菌侵染后的最初几小时,然后急剧下降,且在植物-病原物互作中, PAL 活峰可以有多个, PAL 这种波式活性可能与病原物侵染过程中的阶段代谢特性有关^[10]。还有研究表明,外界因子如低温、机械损伤、光(白光、蓝光、红光、紫外光)、病原菌感染、毒素处理、昆虫取食、生长素(IAA)、激动素(BAP)、赤霉素(GA₃)和乙烯(乙烯利)等都可诱导植物 PAL 基因的表达,且各种因子对 PAL 活性的诱导存在着互作关系^[11]。本试验结果与叶建仁等^[7]用松针褐斑病菌毒素液处理后,无论是抗病针叶还是易感针叶,苯丙氨酸解氨酶的活性在用毒素处理后无明显变化,其结果不一致,且瓶内组培苗和温室组培苗的 PAL 有很大不同,一是达到第1个高峰的时间不同,二是温室移植苗的 PAL 最高值明显比瓶内组培苗的最大 PAL 高。这可能与某些次生代谢产物或组培继代过程中 IAA、6-BA 等激素的积累有关。

(2) PPO 是苯丙烷代谢途径中重要的氧化酶,在酚类物质的合成和氧化中起着重要的作用,在多个病害系统中,这种氧化酶活性的增加与寄主植物的抗病性相关。前人的研究表明, PPO 活性在寄主与病原物非亲和组合中比亲和组合中上升得快且会高数倍。也有一些相反的报道, PPO 在寄主和病原物互作中的活化不一定总与不亲和反应相并发生,并不总是和寄主的抗病性相联系^[12]。因此认为,受侵寄主中 PPO 活性的增加在植物抗感病中的作用,可能取决于特定病害系统中寄主和病原物的遗传及生理生化特征。本研究结果表明,在整个病程中, PPO 出现了2个活性高峰,从最具抗病性的 8#40 来看,后期比前期升高的幅度大,抗性湿地松组培苗的峰值显著高于普通组培苗,抗性越强峰值越高,变化幅度越大, PPO 活性与组培苗病害发展过程表现出一定的相关性;抗性较强无性系的 PPO 活性先下降,后上升,而中抗和普通组培苗的 PPO 活性在毒素处理后波动较小。植株发病后, PPO 活性会迅速下降,由于 PPO 可以催化酚类物质氧化为醌,醌又

会通过聚合作用产生有色物质引起组织褐变^[13],从而引起松针褐斑病的病发。叶建仁等^[6]用松针褐斑病菌毒素液处理湿地松针叶后,多酚氧化酶活力表现下降趋势,抗病株的降幅比易感株的大。

(3) SOD 是膜系统的保护酶, SOD 可消除作物体内活性氧的累积,减少其对细胞膜结构的伤害, POD 和过氧化氢酶(CAT)可把 SOD 等产生的 H₂O₂ 变成 H₂O,与 SOD 有协调一致的作用,使活性氧维持在较低水平上,以维持植物正常的生命活动。本试验得出,在松针褐斑病菌毒素处理后的 6 h 内, SOD 酶活性迅速上升,在处理 6 h 时达到最大,处理 48 h 时达到最小,之后又呈上升趋势,且在处理 168 h 时比处理前高。这表明,松针褐斑病菌毒素处理后湿地松体内的 SOD 活性与湿地松抗病性密切相关,可能是湿地松组培苗在受到松针褐斑病菌毒素侵染后,抗病组培苗的 SOD 活性迅速被激活,以清除或阻止病原菌造成的伤害。

参考文献:

- [1] 叶建仁,韩正敏,李传道. 湿地松抗松针褐斑病无性种子园营建技术研究[J]. 南京林业大学学报, 1991, 15(2): 23-29
- [2] 何月秋. 湿地松抗病家系组培繁殖技术研究[D]. 南京:南京林业大学, 2003
- [3] 朱丽华. 湿地松、火炬松和黑松的组培繁殖技术研究[D]. 南京:南京林业大学, 2004
- [4] 程方. 抗性湿地松组培技术及再生植株形状评价[D]. 南京:南京林业大学, 2010
- [5] 郝德君,谈家金,陈凤毛,等. 黑松和马尾松苗受松材线虫侵染后部分化学物质的响应[J]. 林业科学研究, 2012, 25(2): 218-222
- [6] 叶建仁,黄素红,李传道,等. 抗松针褐斑病湿地松体内氧化酶的变化[J]. 南京林业大学学报, 1995, 19(1): 8-14
- [7] 叶建仁,黄素红,李传道,等. 磷酸葡萄糖脱氢酶和苯丙氨酸解氨酶与抗松针褐斑病的关系[J]. 林业科学, 1994, 30(5): 430-436
- [8] 蒋明义,郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学报, 1996, 22(2): 144-150
- [9] 薛应龙,欧阳光察. 植物抗病的物质代谢基础:植物生理与分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 1992: 423-428
- [10] 毕咏梅,欧阳光察. 稻瘟病菌诱导物对水稻苯丙烷类途径酶系和绿原酸的诱导作用[J]. 植物生理学通讯, 1990(3): 18-20
- [11] 程水源,陈昆松,刘卫红,等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. 果树学报, 2003, 20(5): 351-357
- [12] 陈璋. 水稻抗稻瘟病与苯丙氨酸解氨酶及过氧化物酶活性的相关性[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(4): 275
- [13] 海蒂弗斯 R,威廉斯 P H. 植物病理生理学[M]. 朱有,宋佑衡,傅淑云,等译. 北京:中国农业出版社, 1991