

野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后多酚氧化酶(PPO)活性变化

徐鹏飞¹,常敬礼²,赵福华²,唐鑫华²,郭长军¹,张淑珍¹

(1. 东北农业大学 大豆研究所,大豆生物学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以8个对黑龙江省大豆疫霉菌1号优势生理小种抗感性不同的野生大豆为材料,对接种大豆疫霉菌游动孢子后野生大豆根、茎、叶中多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase,PPO)活性变化情况进行了初步研究。结果表明:抗病野生大豆根和叶中PPO活性在整个病程均比相应对照增加,茎中PPO活性在病程的大部分阶段高于对照,且根中PPO活性高于茎和叶的PPO活性增幅;感病野生大豆根和叶中PPO活性在病程的大部分阶段低于对照。

关键词:大豆疫霉根腐病菌;野生大豆;多酚氧化酶(PPO)

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)01-0099-04

Response of Polyphenol Oxidase Activity in *Glycine soja* Inoculated with *Phytophthora sojae*

XU Peng-fei¹, CHANG Jing-li², ZHAO Fu-hua², TANG Xin-hua², GUO Chang-jun¹, ZHANG Shu-zhen¹

(1. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, Heilongjiang; 2. Agricultural College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: *Phytophthora* root and stem rot of soybean (*Phytophthora sojae*) has become a serious damage to soybean production in China, especially in main soybean production region, Heilongjiang province. Polyphenol oxidase (PPO) is an important enzyme related to disease resistance in plants. However, there are few reports about response of PPO activity in wild soybeans infected with *Phytophthora sojae*. A total of eight wild soybeans including four resistant and four susceptible ones were inoculated with zoospores of *P. sojae* race 1 as treatment and those inoculated with water as control. The results showed that PPO activity in roots and leaves of resistant wild soybeans increased compared with those of control at the whole stage of pathogenetic process, and that in stems also increased at most stages of pathogenetic process. However, the PPO activity in roots and leaves of the four susceptible wild soybeans decreased at most stages of pathogenetic process. The results could lay theoretical basis on physiological and biochemical mechanism for disclosing wild soybean's resistance to *P. sojae*.

Key words: *Phytophthora sojae*; Wild soybeans; Polyphenol oxidase

多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase,简称PPO)是广泛存在于植物体内的一类末端氧化酶,以游离状态存在于细胞质内或束缚于线粒体、叶绿体及其它亚细胞器中^[1]。当植物在病害胁迫时,可激活PPO催化单元酚和邻二羟酚氧化生成醌以及聚合形成单宁类物质,迅速杀死侵入点周围的细胞,使病原生物固定,寄主细胞褐变而表现为过敏性反应^[2-3]。相关报道表明,PPO的活性与植物抗病性正相关,即PPO的活性越高,植物的抗病性越强^[4-7]。

大豆疫霉根腐病是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann)引起的土传毁灭性世界范围大豆病害^[8]。自1991年正式报道在黑龙江省发现大豆疫霉菌以来,在我国的安徽、山东、河南、江苏、浙江、福建、新疆等均有报道,吉林、辽宁、内蒙也有该病发生,对我国大豆生产构成了严重威胁^[9-10]。

虽然大豆疫霉菌具有毒力分化复杂、小种变化快的特点,但抗性育种仍是目前解决该病害最为经济有效的措施。目前我国推广的栽培大豆品种遗传基础狭窄,并且单一化种植带来大豆品种抗性多样性的降低,因而充分挖掘野生大豆资源、阐明野生大豆对疫霉菌的抗性生理生化机理,对拓宽抗性基因资源库及缩短我国抗疫霉根腐病育种进程有着重要的理论指导和现实意义。

课题组对来自全国19个省的415份野生大豆资源进行了抗性评价,获得了抗性资源^[11]。鉴于PPO在植物抗病中的重要作用以及关于PPO活性与野生大豆抗疫霉根腐病关系的研究鲜有报道,该文对大豆疫霉根腐病菌胁迫下的抗感性不同的野生大豆PPO活性的变化进行研究,以为野生大豆抗疫霉根腐病生理生化机制的研究奠定一定的理论基础。

收稿日期:2011-10-24

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12511041)。

第一作者简介:徐鹏飞(1980-),男,博士,助理研究员,研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail:xup2008@163.com。

通讯作者:张淑珍(1972-),女,教授,博士生导师,研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail:dnzhshzh@163.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 病原菌 大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种 (毒力基因 Vir7), 是黑龙江省目前的优势生理小种^[10], 由大豆生物学教育部重点实验室 2008 年在黑龙江省建三江农场分离, 并采用国际通用鉴别寄主即: L75-3735 (*Rps1c*), L75-6141 (*Rps1a*), L77-1863 (*Rps1b*), L83-570 (*Rps3a*), L89-1581 (*Rps6*),

L93-3258 (*Rps7*), P. I. 103 (*Rps1d*), Williams 82 (*Rps1k*), 抗感标准参照 Yang^[12] 进行的毒力基因鉴定。

1.1.2 野生大豆 野生大豆资源共 8 份, 由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供。其中 ZYD00388、ZYD00410、ZYD00841 和 ZYD02405 为抗性资源; ZYD00006、ZYD01153、ZYD02497 和 ZYD02927 为感病资源, 其相关性状及对大豆疫霉菌 1 号生理小种的抗感评价见表 1。

表 1 供试野生大豆农艺性状及抗感评价

Table 1 The agronomic traits of tested wild soybeans and resistance evaluation

编号 Accession	来源 Origin	种皮色 Seed coat colour	脐色 Hilum colour	粒形 Seed shape	茸毛 Pappus	叶形 Leaf shape	抗感性 Resistant/Susceptible
ZYD00388 (R1)	黑龙江	褐色	褐色	椭圆	灰色	长叶	抗
ZYD00410 (R2)	黑龙江	黑色	黑色	椭圆	灰色	长叶	抗
ZYD00841 (R3)	吉林	褐色	褐色	椭圆	灰色	长叶	抗
ZYD02405 (R4)	辽宁	黑色	黑色	椭圆	灰色	长叶	抗
ZYD00006 (S1)	黑龙江	黑色	褐色	椭圆	灰色	长叶	感
ZYD01153 (S2)	吉林	黑色	黑色	椭圆	灰色	长叶	感
ZYD02497 (S3)	辽宁	黑色	黑色	椭圆	棕色	长叶	感
ZYD02927 (S4)	山西	黑色	黑色	椭圆	灰色	长叶	感

1.2 试验方法

1.2.1 种植方法 野生大豆种子机械微破种皮, 每份材料分别取 6 粒种子播种于掺入草炭土的直径为 8 cm 的钵中, 3 次重复。置于生长箱中培养, 温度 25℃, 50% 的相对湿度, 每天光照 14 h。

1.2.2 游动孢子悬浮液的制备 参照左豫虎^[13]的方法略有改动, 用打孔器在菌落边缘内侧打孔, 挑取 8~10 块菌饼转入灭菌的三角瓶内, 加入 20 mL CA 液体培养基, 25℃ 黑暗培养 3 d, 换到土壤浸出液 (20 mL) 中, 光暗交替 (16 h 黑暗), 25℃ 培养 1~2 d 可见大量孢子囊形成。将产生大量孢子囊的三角瓶内的土壤浸出液倒出, 加入 20 mL 无菌蒸馏水, 置 4℃ 冰箱中 20~30 min 后, 取出置于 25℃ 培养, 30 min 后即有大量游动孢子释放, 6 h 后游动孢子大量产生。用无菌水配制成浓度约为 1×10^5 个孢子 \cdot mL⁻¹ 游动孢子悬浮液, 置室温下保存待用。

1.2.3 接种及取样 采用游动孢子全苗接种法, 待野生大豆真叶完全展开后, 用水将盆土充分浸泡, 将泥土轻轻倒出, 用流水慢慢冲洗, 洗净根上所有附泥, 然后将整个植株根部浸没在游动孢子悬浮液中, 以蒸馏水为对照。接种后将处理和对照放在 25℃ 保湿箱中保温保湿。

接种后 12、24、36、48、60 和 72 h 分别取样, 每

次取各供试野生大豆的整个植株 (每次取 3 株), 用无菌冰水洗净后擦干, 液氮冷冻后保存在 -20℃ 的冰柜中备用。

1.2.4 酶液提取及酶活性的测定 酶液提取参考李合生^[14]的方法, 并稍作修改。分别称取 0.2 g 根、茎、叶, 加入 0.1 mol \cdot L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH 7.8) 4 mL, 冰浴研磨匀浆后, 4℃ 下离心 (3000 r \cdot min⁻¹) 20 min, 取上清液, 置于 4℃ 冰箱中备用。

酶活性的测定参考李合生^[14]的方法, 在试管中加入 1.5 mL 0.05 mol \cdot L⁻¹ pH 6.0 磷酸缓冲液和 0.04 mL 酶提取液, 混匀后于 30℃ 水浴中保温 10 min, 然后加入 1.5 mL 0.2 mol \cdot L⁻¹ 邻苯二酚溶液, 立即计时, 混匀后用 1 cm 比色皿在 398 nm 处测定反应 2 min 的 OD 值。空白以 1.5 mL 磷酸缓冲液代替邻苯二酚溶液。每个样品酶液重复测定 3 次。酶活性表示为 OD_{398nm} \cdot g⁻¹ \cdot min⁻¹ \cdot cm⁻¹, 样品 PPO 活性计算公式如下:

$$\text{多酚氧化酶活性} = \frac{\text{OD}_{398\text{nm}} \times N}{(\text{OD}_{398\text{nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times W \times T \times n \times d}$$

其中, N-酶液总体积 (mL), W-样品鲜重 (g), d-比色皿直径 (cm), T-反应时间 (min), n-反应体系中所用的酶液体积 (mL)。

为消除抗感野生大豆在接种前根、茎、叶中 PPO 活性的差异,根据计算出的 PPO 酶活性值,计算供试品种接种后根、茎、叶中的 PPO 活性变化率,公式如下:

$$\text{PPO 活性变化率}(\%) = (A_1 - A_0) / A_0 \times 100$$

其中, A_1 -接种后供试品种中 PPO 活性 ($\text{OD}_{398\text{nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), A_0 -未接种健株(蒸馏水中培养的对照)中 PPO 活性 ($\text{OD}_{398\text{nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

1.3 数据分析

试验数据使用 SPSS 17.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 接种前野生大豆 PPO 活性

由图 1 可以看出,接种前抗病野生大豆根中 PPO 活性除 R4 较低外,其余均高于感病野生大豆;而接种前茎中 PPO 活性在抗感野生大豆间无明显规律;感病野生大豆叶中 PPO 活性除 S3 外,均低于抗病野生大豆。

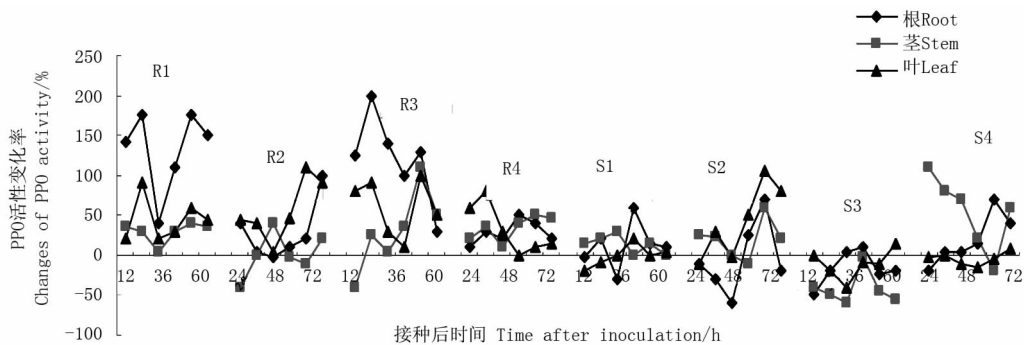


图 2 接种大豆疫霉菌游动孢子后抗感野生大豆根、茎、叶中 PPO 活性变化率

Fig. 2 Changes of PPO activity in roots, stems, leaves of wild soybeans infected with zoospores of *Phytophthora sojae*

接种大豆疫霉菌游动孢子后,除感病野生大豆 S3 茎中 PPO 活性在整个病程均低于对照外,其余抗感野生大豆茎中 PPO 活性在病程的大部分阶段均高于对照。

接种大豆疫霉菌游动孢子后,抗病野生大豆叶中 PPO 活性几乎在整个病程均比对照增加,而感病野生大豆除 S2 叶中 PPO 活性在接种后大部分阶段较对照增加外,其余 3 个野生大豆在病程的大部分阶段叶中 PPO 活性低于相应对照或与对照持平。

总体而言,接种疫霉菌 1 号生理小种游动孢子后,抗病野生大豆根和叶中 PPO 活性在整个病程均比相应对照增加,茎中 PPO 活性在病程的大部分阶段高于对照,且根中 PPO 活性高于茎和叶的 PPO 活性增幅;感病野生大豆根和叶中 PPO 活性在病程的

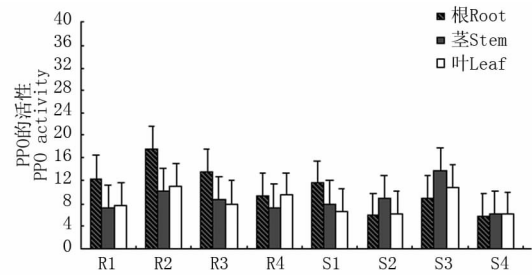


图 1 抗感野生大豆接种前根茎叶中 PPO 活性比较
Fig. 1 The PPO activity in roots, stems and leaves of wild soybeans before inoculation

2.2 接种后抗感野生大豆 PPO 活性的变化

由图 2 可以看出,接种大豆疫霉菌游动孢子后,抗病野生大豆根中 PPO 活性在整个病程与相应的对照相比均有不同程度的增加,且 R1 和 R3 根中 PPO 活性在病程的大部分阶段增幅较大;感病野生大豆 S3 根中 PPO 活性在病程的大部分阶段均低于对照,S2 和 S4 根中 PPO 活性随接种后时间的不同发生变化,在病程的大部分阶段 PPO 活性低于对照或与对照持平,只有 S1 在接种后的部分阶段稍高于对照。

大部分阶段低于对照。

3 结论与讨论

PPO 能将酚类物质氧化成对病原菌有毒的醌类物质。因此该酶也常作植株抗病性的指标之一。病原生物侵染植株会提高受侵染组织内的 PPO 酶活性,且 PPO 活性越高,植物的抗病性越强^[5-7],PPO 与抗病性成正相关^[15-16]。相关研究表明,栽培大豆接种大豆疫霉菌后,抗病品种根和茎中 PPO 活性比对照增加,叶中 PPO 活性变化不大,而感病品种根和茎中 PPO 活性在病程的大部分阶段低于对照^[17]。

该研究用大豆疫霉菌游动孢子侵染抗感不同的野生大豆植株,结果抗病野生大豆根中 PPO 活性

增幅高于茎和叶,感病野生大豆根和叶中 PPO 活性在病程的大部分阶段低于对照。结合葛秀秀^[17]的研究结果可知,接种疫霉菌后,抗病栽培大豆及野生大豆根中 PPO 活性均比对照增加,而感病材料相反,这可能是由于大豆疫霉菌游动孢子最先感染根部,而根部的 PPO 活性变化更能敏感的体现抗感大豆间的差异。但根中 PPO 活性能否作为大豆对疫霉根腐病抗性鉴定的一个生化指标从而指导抗病品种的选育,还需更多材料做进一步的验证。

参考文献

- [1] Meyer A M, Harel E. Polyphenol oxidase in plants[J]. *Phytochemistry*, 1979, 18:193-215.
- [2] 李华琴. 小麦抗感白粉病生理生化特性的研究—II. 小麦感染白粉病后过氧化物酶及多酚氧化酶的变化[J]. *贵州农业科学*, 1983(2):40-45. (Li H Q. Wheat powdery mildew resistant and susceptible study on physiological and biochemical characteristics—II. Wheat powdery mildew infection of peroxidase and polyphenol oxidase changes [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 1983(2):40-45.)
- [3] 马奇祥, 何家泌. 不同抗性小麦品种感染根腐叶斑病前后生化特性的研究[J]. *河南农业大学学报*, 1992, 26(1):38-43. (Ma Q X, He J M. Biochemical studies on wheat varieties with different resistance to bipolaris sorokinian [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 1992, 26(1):38-43.)
- [4] 云兴福, 崔世茂, 霍秀文. 黄瓜组织中几种酶活性与其对霜霉病抗性的关系[J]. *华北农学报*, 1995, 10(1):18. (Yun X F, Cui S M, Huo X W. The relationships between the activity of several enzymes in cucumber tissues and their resistance to downy mildew of cucumber [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1995, 10(1):18.)
- [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[J]. *植物生理学通讯*, 1997, 33(3):175-177. (Song F M, Zheng Z, Ge X C. Changes of polyphenoloxidase activity in cotton seedlings after infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* [J]. *Plant Physiology Communication*, 1997, 33(3):175-177.)
- [6] 张丽娟, 杜金哲, 杨庆凯. 大豆感染灰斑病菌后叶片中多酚氧化酶活性的变化[J]. *华北农学报*, 2006, 21(5):91-95. (Zhang L J, Du J Z, Yang Q K. Study on the changes of polyphenol oxidase in soybean varieties leaves infected by *Cercospora sojina* Hara [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2006, 21(5):91-95.)
- [7] 房玉林, 宋士任, 张艳芳, 等. 不同品种葡萄抗霜霉病特性与叶片 POD、PPO 活性关系的研究[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(2):392-395. (Fang Y L, Song S R, Zhang Y F, et al. Relationship of downy mildew resistance with leaf POD and PPO activities of different grapevine varieties [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2007, 27(2):392-395.)
- [8] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean [J]. *Plant Disease*, 1985, 69(4):362-368.
- [9] 朱振东, 王晓鸣, 常汝镇, 等. 黑龙江省大豆疫霉菌生理小种鉴定及大豆种质的抗性评价[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(1):62-67. (Zhu Z D, Wang X M, Chang R Z, et al. Identification of race of *Phytophthora sojae* and reaction of soybean germplasm resources in Heilongjiang province [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(1):62-67.)
- [10] Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Races of *Phytophthora sojae* and their virulences on commonly grown soybean varieties in Heilongjiang, China [J]. *Plant Disease*, 2010, 94:87-91.
- [11] 靳立梅, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 野生大豆种质资源对大豆疫霉根腐病抗性评价[J]. *大豆科学*, 2007, 26(3):300-304. (Jin L M, Xu P F, Wu J J, et al. Identification the resistance of wild soybean germplasm to *Phytophthora sojae* [J]. *Soybean Science*, 2007, 26(3):300-304.)
- [12] Yang X B. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields [J]. *Plant Disease*, 1996, 80:1418-1420.
- [13] 左豫虎, 臧忠婧, 刘惕若. 影响大豆疫霉菌游动孢子产生的条件[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(3):241-245. (Zuo Y H, Zang Z J, Liu T R. Studies on production condition of zoospores of *Phytophthora sojae* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31(3):241-245.)
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. (Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.)
- [15] 苗则彦, 赵奎华, 刘长远, 等. 葡萄抗感白腐病品种 PAL 酶、PPO 酶、SOD 酶活性比较[J]. *沈阳农业大学学报*, 2003, 34(3):177-180. (Miao Z Y, Zhao K H, Liu C Y, et al. Comparison to enzyme activities of PAL, PPO and SOD of resistant and susceptible cultivars to grape white rot [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2003, 34(3):177-180.)
- [16] 于凤鸣. 葡萄抗感霜霉病品种三项生化指标的比较[J]. *河北农业技术师范学院学报*, 1998, 12(2):68-70. (Yu F M. Grape downy mildew resistant and susceptible varieties of three biochemical indexes [J]. *Journal of Hebei Agrotechnical Teachers College*, 1998, 12(2):68-70.)
- [17] 葛秀秀. 大豆抗疫霉根腐病机制的初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001. (Ge X X. Study on resistance mechanism of soybeans infected by *Phytophthora sojae* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2001.)