

过氧化物酶与水稻抗瘟性*

余晓明¹ 季本仁² 段金玉²

(1 云南农业大学基础部, 昆明) (2 中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

摘要 以4个对稻瘟菌 (*Pyricularia oryzae*) 抗感性不同的水稻品种为材料, 研究了3叶期稻苗受稻瘟菌 C₁₃ 小种感染后叶片过氧化物酶活性变化和过氧化物酶同工酶 (EC 1. 11. 17) 的结果表明, 接种后抗感品种过氧化物酶活性均增加, 抗病品种接种后 48 h 过氧化物酶活性增至最大, 随后逐渐降低; 接种早期感病品种过氧化物酶活性缓慢增加, 96 h 后酶活性骤然持续升高; 感病品种过氧化物酶活性始终高于抗病品种, 过氧化物酶活性急剧上升的时期正好是被侵寄主细胞死亡、病斑快速扩展的时期。接种后抗感品种过氧化物酶同工酶的数量无差异, 均含有 24 条酶带, 感病品种同工酶 10、11 和 20 的活性比抗病品种的强。据此认为, 接种后过氧化物酶活性的增加仅仅是寄主对病原侵染损伤的反应, 与抗瘟性呈负相关; 过氧化物酶活性的增加至少部分是同工酶 10、11 和 20 因病原侵染被激活的结果。

关键词 水稻 稻瘟菌 抗性 过氧化物酶 过氧化物酶同工酶

植物受病原菌侵染后过氧化物酶活性会增加^(9~11), 在植物体内过氧化物酶行使多种生理功能, 它参与木质素的合成⁽⁷⁾, 植物保卫素的合成^(11,12) 以及酚类的氧化⁽⁸⁾, 有人还报道⁽¹³⁾, 过氧化物酶可直接抑制病原细菌的生长, 过氧化物酶同工酶质和量的变化与抗病性有关⁽²⁾。

本文研究了不同抗感水稻品种人工接种稻瘟菌后叶片过氧化物酶活性, 过氧化物酶同工酶的变化规律, 试图弄清过氧化物酶与水稻抗瘟性的关系。

1 材料和方法

1.1 供试材料和育苗

供试水稻品种为桂朝 2 号、小白谷、滇榆 1 号、丽江新团黑谷等 4 个品种, 供试稻瘟病菌菌种为 C₁₃ 生理小种 (云南农业大学植保系朱有勇提供)。

水稻种子用 10% 次氯酸钠溶液表面消毒 20 min, 蒸馏水冲洗数次, 于 26℃ 温箱催芽 3 天, 每个品种选取 100 粒发芽种子播种于 30 cm × 40 cm × 5 cm 育苗盘⁽¹⁾, 温室培育至 3 叶期, 管理力求均一, 稻瘟病菌菌种先在淀粉培养基上避光培养 7 天, 再转移至大麦粒培养基扩大培养 20 天 (26℃ 黑暗), 用无菌水洗断大麦粒表面菌丝, 于 26℃、保湿见光培养 3 天, 待大麦粒表面长满孢子后用蒸馏水浸洗孢子, 双层沙布过滤, 滤液

* 1991—04—17 收稿

经适当稀释成 1×10^5 个孢子/ml 孢子悬浮液, 接种后每隔 24 h 采样, 连续 7 天比较研究不同抗感水稻品种人工感染稻瘟病后叶片过氧化物酶活性的变化。

1.2 接种试验

待稻苗长至 3~3.5 叶期时用喷雾枪喷雾接种, 每盘秧苗接种 50 ml 孢子悬浮液, 对照用等量蒸馏水代替孢子悬浮液, 接种后稻苗在暗室中保湿培养 24 h 再移至温室见光培养。

1.3 水稻品种的抗性鉴定

接种后第 7 天, 调查稻叶发病情况, 根据文献^[15]所列标准确定各水稻品种的抗性类型。

1.4 过氧化物酶的提取

选取稻苗第 2、第 3 片叶 0.5 g, 液氮冰冻磨碎, 以 1:2 (w/v) 的 10 mM pH 7.0 磷酸盐缓冲液于 0~4℃ 冰箱提取 1 h, 14 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于电泳或经适当稀释后用于测定过氧化物酶活性。

1.5 过氧化物酶活性的测定

参照北京大学方法^[2], 用愈创木酚—过氧化氢试剂 (20 mM 愈创木酚, 10 mM pH 7.0 磷酸盐缓冲液, 40 mM 过氧化氢, 酶粗提液 20 μ l, 总体积 2.99 ml), 在岛津 UV-260 机上 25℃ 恒温比色, 比色波长为 470 nm, 过氧化物酶活性以 1 g 鲜重每分钟的光密度变化 ($\Delta OD_{470} / \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{Fr} \cdot \text{W}$) 表示。

1.6 过氧化物酶同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳

按聂崇兴方法^[5], 分离胶 T=7%, C=4%, 浓缩胶 T=3.5%, C=20%, 电极缓冲液为 pH 8.3 Tris—甘氨酸, 在 LKB 多用垂直板电泳仪上进行电泳, 上样量 100 μ l, 4℃ 恒温, 50 mA 恒流, 电泳 2.5 h。

染色液按醋酸联苯胺: 0.3% H_2O_2 : H_2O =1:0.4:18.6 比例临用前混合, 室温显色 10~20 min, 拍照, 胶板经蒸馏水冲洗后制成干板永久保存。

2 实验结果

2.1 供试品种的抗病性

采用苗期喷雾接种法鉴定出供试的 4 个水稻品种分别代表 4 种不同的抗病类型 (表 1)。

表 1 水稻品种的抗性鉴定结果

Table 1 The resistant type of rice varieties

生理小种 Physio.race	桂朝 2 号 Guizhao 2	小白谷 Xiaobaigu	滇榆 1 号 Dian yui	丽江新团黑谷 Lijiang xintuanheigu
ZC ₁₃	抗 (R)	中抗 (MR)	中感 (MS)	感 (S)

2.2 接种后不同抗感水稻品种叶片过氧化物酶活性变化

研究表明 (图 1), 抗病品种过氧化物酶活性在接种早期增加, 48 h 后缓慢降低, 变化趋于平缓, 接种后感病品种过氧化物酶活性先是缓慢增加, 到第 96 h 开始骤然持续上升, 中抗和中感品种过氧化物酶活性的变化与感病品种的相似, 即接种早期缓

慢增加, 96 h 后急剧上升. 感病品种过氧化物酶活性在接种后的 7 天里始终高于抗病品种 (图 2).

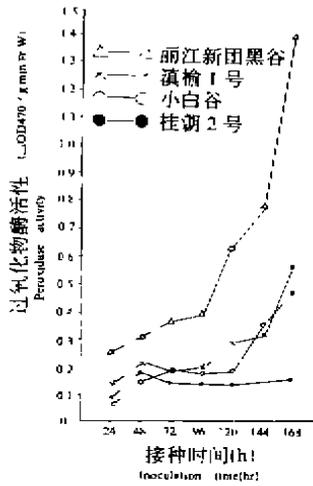


图 1 接种稻瘟菌谷不同抗感水稻品种叶片过氧化物酶活性变化
 丽江新团黑谷△—△; 滇榆一号×—×;
 小白谷○—○; 桂朝 2 号●—●
 Fig.1 Time course of peroxidase activity of rice leaves after inoculation.
 Lijiangxintuanheigu △—△; Dianyu 1 ×—×;
 Xiaobaigu ○—○; Guizhao 2 ●—●.

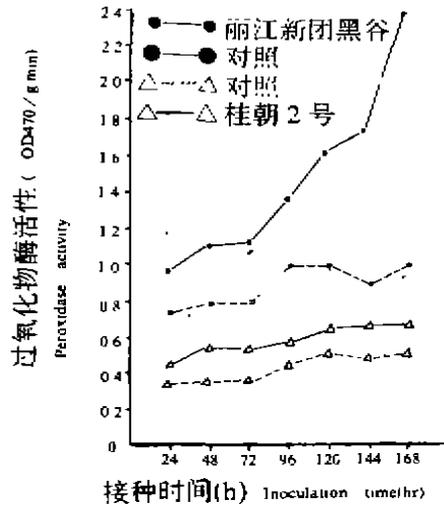


图 2 接种谷抗感水稻品种过氧化物酶活性变化
 丽江新团黑谷●—●; 对照●—●;
 桂朝 2 号△—△; 对照△—△.
 Fig.2 Time course of peroxidase activity of resistant and susceptible cultivars.
 Lijiangxintuanheigu ●—●, Check ●—●;
 Guizhao 2 △—△; Check △—△.

稻瘟菌的侵染历程及寄主反应的细胞组织学研究^[4]表明, 稻瘟菌孢子接触寄主湿润表面 4 h 后开始萌发, 24 h 内形成附着胞, 并从稻叶表皮细胞中胞壁较薄的运动细胞或气孔助细胞入侵, 48 h 后菌丝在寄主细胞内发育. 从这阶段开始, 抗感品种的反应表现出差异. 抗病品种被侵细胞细胞质变黄, 颗粒化, 侵入菌丝发育不良, 停止伸长, 随寄主细胞一同死亡; 感病品种受侵细胞内菌丝旺盛发育, 逐渐向邻近细胞和组织蔓延, 寄主细胞反应迟钝, 与菌丝暂时共存后才逐渐坏死. 本实验观察到, 接种后 3~4 天即可看到稻叶表面出现病斑, 抗病品种的病斑是褐点型的, 并保持不再扩展, 而感病品种的病斑, 刚出现时为点状, 在随后的 1~2 天中病斑迅速扩大成典型的急性型斑.

如果把水稻叶片过氧化物酶活性的变化 (图 1、图 2) 与稻瘟病病程相比较即可发现, 感病品种过氧化物酶缓慢增加的时期是侵入菌丝与寄主细胞暂时共存, 寄主细胞死亡较少的时期, 96 h 后过氧化物酶活性急剧上升正好与寄主细胞大量坏死, 病斑快速扩展相对应. 抗病品种过氧化物酶活性增加的时期 (接种 48 h 内) 与寄主细胞过敏性坏死相一致, 由于侵入菌丝在侵染早期随寄主细胞一同死亡, 寄主受害面积不再扩大, 相对应的过氧化物酶活性降低. 为此, 可认为过氧化物酶活性的增加仅仅是寄主对病原侵染的一种损伤反应, 与抗病性负相关. 前人^[6,15]的研究也得到了类似的结论.

2.3 不同抗感水稻品种感染稻瘟菌后叶片过氧化物酶同工酶

我们曾试图通过比较不同抗感水稻品种感染稻瘟菌后叶片过氧化物酶同工酶的变化来寻求与抗性或感性有关的同工酶. 经多次实验发现, 供试的 4 个水稻品种在接种后的

7 天内过氧化物酶同工酶谱无差异, 均含有 24 条酶带, 重现性好, 酶带间的活性大小图 3 显示. 抗感品种同工酶 10, 11 和 20 的活性接种后均增加, 但是感病品种的活性比抗病品种的高. 过氧化物酶同工酶活性的这种变化与过氧化物酶活性的变化相类似, 由于过氧化物酶总活性是每个同工酶的反映, 因此我们认为感病后稻叶过氧化物酶活性的增加至少部分是同工酶 10, 11 和 20 活性增高的结果. 还由于接种后不同抗感水稻品种叶片过氧化物酶同工酶谱无差异, 说明过氧化物酶活性的增加是寄主本身的贡献而非病原的.

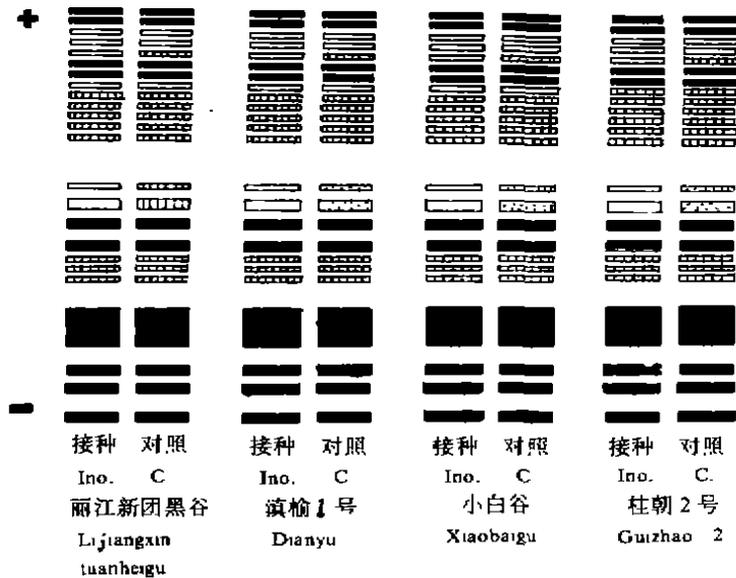


图 3 接种稻瘟菌后不同抗感水稻品种叶片过氧化物酶同工酶谱

Fig.1 The isoperoxidase patters of rice leaves after inoculation

活性大小 (activity): >

3 讨论

植物受病原侵染或受外伤, 细胞内过氧化物酶活性持续上升, 这是植物对伤害的普遍反应, 不少学者认为过氧化物酶活性的增高是抗瘟的基础^[4, 6], 然而也有不少学者认为过氧化物酶活性增加与抗瘟性不能直接联系^[1, 15]. 在我们的实验中发现, 人工接种稻瘟菌后抗感水稻品种过氧化物酶活性均增加, 而且抗感品种过氧化物酶活性的最大增长期与被侵寄主细胞死亡, 病斑快速扩展期相平行, 说明过氧化物酶活性的增加仅仅是寄主对稻瘟菌侵染的一种损伤反应, 与抗瘟性负相关. 接种后抗感品种过氧化物酶同工酶的数量无差异, 感病品种同工酶 10, 11 和 20 的活性比相应的抗病品种的强, 说明过氧化物酶活性的增加至少部分是同工酶 10, 11 和 20 活性增强的结果.

本实验结果是否代表普遍性还有待今后进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 王国梁, 卢浩然, 陈启锋. 福建农学院学报, 1986, 15 (3): 195~203
- 2 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术, 北京: 人民教育出版社, 1982. 179
- 3 段永嘉, 朱有勇, 陈海如, 纳信真. 云南农业大学学报, 1987, 2 (2): 9~19
- 4 高坂掉尔, 山崎义人编; 肖连成译. 稻瘟病与抗病育种. 吉林卫生处, 1983. 137~397
- 5 聂崇兴. 生物化学与生物物理学进展, 1987, 1: 50
- 6 黄新汉, 黄厚哲. 厦门大学学报自然科学报版, 1986, 25: 461~469
- 7 Freudenberg K. Nature, 1959, 183: 1152~1155
- 8 H.J Grambow, B Langenbeck-schwich. Planta, 1983, 157: 131~137
- 9 Johson L B, Lee R F. Physio. Plant Pathology, 1978, 2: 113~181
- 10 Jennings P H, Brannaman B L, Zschule F P. Phytopathology, 1969, 59: 963~967
- 11 L Nadolny, L Sequeira. Physio. Plant Pathology, 1980, 10: 1~8
- 12 Lovrekovich L, Low H, Stahmann M A. Phytopathology, 1967, 58: 193~198
- 13 Macko V, W Woodbury, N A Stahmann. Phytopa, 1968, 58: 1250~1254
- 14 Ravindra N Chibbar, Robert B Van Huystee. Plant Physiol., 1984, 75: 956~958
- 15 松山邦臣, 铃木幸雄. 日植病报, 1981, 47: 654~661

The Relationship Between Peroxidase and Resistance to Rice Blast Disease

Yu Xiaoming¹ Ji Benren² Duan Jinyu²

(1 Department of Fundamental Sciences, Y A U, Kunming)

(2 Kunming Institute of Botany, Acadmia Sinica, Kunming)

Abstract The increase of peroxidase activity of resistant rice leaves occurred within 48 h after inoculation. However, sudden increase occurred 3~7 day after inoculation in susceptible case. The highest activity of susceptible leaves was observed at the time of rapid lesion enlargement. There were no differences in isozyme pattern of both resistant and susceptible leaves tested. But activity of isozyme 10, 11 and 20 of susceptible leaves was higher than that of resistant ones. These results indicated that the increase of peroxidase activity is possibly the response of host cell collapse or physiological disorder and not be directly involved in the resistance mechanism.

Key words Rice *Pyricularia oryzae* Disease resistance Peroxidase Isoperoxidase