

杂交稻抗感白叶枯病与活性氧伤害 及防御酶系统的关系

吴岳轩 曾富华

(湘潭师范学院生物系, 湘潭 411201)

摘要 以对白叶枯病抗感不同的三个杂交稻为材料, 在三叶期接种白叶枯病强毒菌株 76-25, 结果表明, 杂交稻接种白叶枯病菌 72h 后, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性和过氧化物酶(POX)活性升高, 超氧化物歧化酶(SOD)活性下降, 膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量增加, 且抗病组合的变化幅度大于感病组合, 说明杂交稻抗白叶枯病与活性氧伤害及保护酶系的活性相关。

关键词 杂交稻; 白叶枯病; 活性氧; 防御酶系

STUDY ON THE CORRELATION OF RESISTANCE AND SUSCEPTIBILITY TO BACTERIAL BLIGHT WITH THE ACTIVE OXYGEN AND THE DEFENSIVE ENZYMES IN HYBRID RICE SEEDINGS

Wu Yuexuan Zeng Fuhua

(Department of Biology, Xiangtan Normal College, Xiangtan 411201)

Abstract Three hybrid rice combinations, with resistance, susceptibility and hypersensitivity to bacterial blight of rice, namely $V_6(R)$, $U_{1/312}(S)$ and $S_{63}(HS)$, were inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 76-25 strain with strong virulence at the three-leaf stage, the uninoculated plants were used as control. The leaves were taken for biochemical analysis after 72 h of inoculation. The results showed that both PAL and POX activities were increased, while the SOD activities were decreased and the MDA content was increased. The changes of all above indexes of resistant combination V_6 were more significant than that of susceptible combinations $U_{1/312}$ and S_{63} . However, the decrease of soluble protein content in the leaves of $U_{1/312}$ and S_{63} were more significant than that of V_6 .

Key words Hybrid rice; Bacterial blight of rice; Active oxygen; Defensive enzymes

白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 是亚洲稻区广为流行的一种细菌性病害, 也是

农业部北京农业大学植物生理生化开放实验室资助课题。

1994-09-01 收稿; 1995-02-13 修回

水稻主要的三大病害之一, 流行年份严重影响水稻的稳产和高产, 引起了广泛重视。目前, 有关水稻白叶枯病的研究主要集中于抗源筛选、抗性遗传和抗性育种等方面^[1,2], 而有关水稻抗白叶枯病生理生化机制方面的研究尚少。在我国杂交稻推广面积日益增加, 但由于水稻白叶枯病抗性基因多为隐性基因或不完全显性基因而不宜用于杂交稻育种^[3], 因此, 大部分杂交稻对白叶枯病抗性不良。有关杂交稻接种白叶枯病菌后, 与细胞内活性氧及防御酶系统的关系尚未见有报道, 本文对杂交稻感染白叶枯病菌后, 叶片中 PAL、POX、SOD 活性、MDA 含量和可溶性蛋白质含量的变化及其与杂交稻抗白叶枯病的相关性进行了初步研究, 为进一步研究杂交稻抗白叶枯病的生理生化机制及杂交稻的抗性育种提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及接种处理

供试材料 根据生产上和 在病圃中对杂交稻抗白叶枯病鉴定的结果, 选用三个抗性等级不同的杂交稻为试验材料, 即抗性 (R) 材料威优 6 号 (V₆)、感病 (S) 二系杂交稻优 1/312 (U_{1/312}) 及高感 (HS) 材料汕优 63 (S₆₃)。

供试菌种 为水稻白叶枯病强毒菌株 76-25, 由湖南农业大学植保系提供。

材料培养及接种处理 供试种子经 0.1% 氯化汞消毒处理, 于 28℃ 浸种催芽, 精选露白种子, 播种于尼龙网架上。当幼苗长至三叶期时, 用针刺法于第 3 叶上接种白叶枯病强毒菌株 76-25, 菌液浓度为 3×10^8 细胞/ml, 每叶 5 针。接种后将幼苗置于有机玻璃培养室内, 保持 90% 左右的湿度, 26-30℃ 培养 3d, 取样测定各项生理生化指标。以不接种 (针刺但不沾菌液) 处理为对照。

1.2 生理生化指标测定

苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性测定 取第 2, 3 叶片共 1.0g 按薛应龙^[4]的方法提取和测定酶活性。在 752 型紫外/可见分光光度计上测定 O.D_{290nm}, 以 O.D 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位, 换算成 units g⁻¹FW h⁻¹。

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量的测定 取第 2, 3 叶共 1.0g 按林植芳等^[5]的方法测定 SOD 活性及 MDA 含量。SOD 酶活性计算按照 Asada 公式 SOD units/ml = (V/v-1) × (dilution factor) (V 和 v 分别为无 SOD 和有 SOD 条件下, NBT 的光还原速率, 稀释因子即酶液稀液倍数) 进行计算, 并换算成 units g⁻¹FW。

过氧化物酶 (POX) 活性测定 采用愈创木酚法进行测定, 反应混合液中含有 2.65ml 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH5.8), 0.1ml 0.18mol/L 愈创木酚, 0.20ml 0.03mol/L H₂O₂ 和 0.05ml 酶液。20℃ 反应 5min, 于 460nm 测定 O.D 值, 以 0.1O.D/min 为 1 个酶活性单位, 换算成 units g⁻¹FW。

可溶性蛋白质含量测定 用考马斯亮蓝 G-250 法测定^[6]。

2 结果与分析

2.1 杂交稻接种白叶枯病菌后 PAL 活性及 POX 活性的变化

表1说明, 杂交稻接种白叶枯病菌后, PAL活性和POX活性都增加, 但不同材料间的变化幅度存在较大差异。与对照相比, 接种后的 V_6 、 $U_{1/312}$ 和 S_{63} PAL活性分别增加了72.7%、31.0%和28.6%; POX活性分别增加了12.2%、4.4%和3.2%。抗病的 V_6 增加幅度显著高于感病的 $U_{1/312}$ 和 S_{63} , 其中高感的 S_{63} 增幅较少。这说明白叶枯病菌诱导杂交稻PAL和POX活性的变化幅度与杂交稻对白叶枯病的抗性有关。

表1 接种白叶枯病菌后杂交稻叶片PAL和POX活性的变化
Table 1 Change of PAL and POX activities in leaves of hybrid rices after inoculation with *X. oryzae* pv. *oryzae*

材料 Material	PAL 活性 PAL activity (units g ⁻¹ FW h ⁻¹)		POX 活性 POX activity (units g ⁻¹ FW)	
	对照 CK	接种 Inoculation	对照 CK	接种 Inoculation
V_6	44	76	2232	2504
$U_{1/312}$	58	76	3808	3976
S_{63}	56	72	2216	2288

2.2 杂交稻接种白叶枯病菌后SOD活性及MDA含量的变化

三个杂交稻接种白叶枯病菌后, SOD活性均下降。 V_6 、 $U_{1/312}$ 和 S_{63} 的SOD活性分别下降了49.3%、43.0%和37.4%, 其下降幅度与抗病性相关。伴随SOD活性下降, 膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)累积。接种感染株与健株相比, MDA含量分别增加了60.5%(V_6)、22.5%($U_{1/312}$)和8.6%(S_{63}), 其增加幅度也与抗性相关。说明杂交稻在感染白叶枯病菌后发生了由活性氧引发的膜脂过氧化作用。

表2 接种白叶枯病菌后杂交稻叶片SOD活性及MDA含量的变化
Table 2 Change of SOD activity and MDA content in leaves of hybrid rices after inoculation with *X. oryzae* pv. *oryzae*

材料 Material	SOD 活性 SOD activity (units g ⁻¹ FW)		MDA 含量 MDA content (μ mol g ⁻¹ FW)	
	对照 CK	接种 Inoculation	对照 CK	接种 Inoculation
V_6	396.0	201.0	1.849	2.968
$U_{1/312}$	327.6	186.7	3.097	3.785
S_{63}	171.9	107.6	2.495	2.710

表2的结果还表明: 健株内SOD活性与杂交稻抗白叶枯病相关, 即杂交稻对白叶枯病的抗性越强, 体内SOD活性越高, 抗病的 V_6 健株内SOD活性是感病的 S_{63} 的2.3倍。接种白叶枯病菌后, 尽管SOD活性下降, 但抗病材料SOD活性仍高于感病材料, 这表明在杂交稻抗白叶枯病上, SOD可能起着比较大的作用。

2.3 杂交稻接种白叶枯病菌后可溶性蛋白质含量的变化

表3说明, 杂交稻接种感染白叶枯病菌后, 可溶性蛋白质含量下降, 且感病组合的下降幅度大于抗病材料, V_6 、 $U_{1/312}$ 和 S_{63} 分别下降了13.0%、20%和27.5%, 这与庄炳昌等^[6]在研究大豆接种SMV后可溶性蛋白质含量变化的结果一致。

表3 接种白叶枯病菌后杂交稻叶片可溶性蛋白质含量的变化

Table 3 Change of soluble protein content in leaves of hybrid rices after

inoculation with <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (mg g ⁻¹ FW)		
材料 Material	对照 CK	接种 Inoculation
V ₆	34.5	30.0
U _{1/β12}	35.1	28.0
S ₆₃	36.0	26.1

3 讨论

植物抗病反应的机制是多方面的,包括木质化作用、植保素的合成以及病原相关蛋白(PRS)等^[7-9]。其中木质化作用及某些植保素的形成均与苯丙烷类代谢途径相关,而PAL是苯丙烷类代谢途径的限速酶,许多研究表明植物感染病原物后PAL活性均有升高的表现,并与植物的抗病性有着密切的关系^[3]。而POX由于参与了木质素的聚合过程,在水稻的抗病生化机制中被认为是一个关键性的酶^[10]。我们的试验结果表明,杂交稻接种感染白叶枯病菌后,PAL、POX活性升高,尤以抗病性强者的增加幅度较大。可见,杂交稻的抗白叶枯能力可能与加速木质化作用和植保素的形成有关。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POX)和过氧化氢酶被认为是细胞内重要的活性氧防御酶系统,由于过氧化氢酶在植物抗病反应中的变幅很少,因而认为它与植物抗病性关系不大^[11]。植物染病后,影响了体内活性氧代谢的平衡及体内防御酶系统的稳定性。Keppler等^[12,13]发现烟草悬浮细胞、叶片及黄瓜子叶由病原菌诱发的过敏反应(HR)与O₂引发的膜脂过氧化作用有关,他们认为活性氧在寄主-病原物相互作用中的细胞死亡崩溃及诱导植保素的累积中起着重要作用。植物染病后体内防御酶系统的活性也发生改变,Keppler等^[13]用烟草悬浮细胞接种(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)(HR)2h后MDA累积量最大,而SOD活性最低;但他们^[12]用黄瓜子叶做材料研究其抗病反应时,无论是HR还是染病,SOD活性均没有变化;Croft等^[14]在研究菜豆接种(*P. syringae* pv. *phaseolicola*)小种I(HR)6h内,SOD活性下降,12h后SOD活性和POX活性大幅度上升,约18h后趋于稳定;庄炳昌等^[6]发现大豆接种SMV后,叶片SOD活性下降、POX活性上升;王雅平等^[15]发现小麦感染赤霉病后,0-24h SOD活性逐渐上升,而24h后则逐渐下降;我们则发现杂交稻接种白叶枯病菌72h后,SOD活性下降、POX活性上升。这些结果的不同可能与不同植物、不同病原物、植物受侵染后产生反应所需时间及不同测定时期有关;但这些结果都说明了植物感染病原后体内活性氧产生及清除酶系统发生了改变。我们的试验结果表明,杂交稻感染白叶枯病菌后,SOD活性下降,膜脂过氧化作用加强,即确实发生了活性氧的伤害,且抗病材料的变化幅度大于感病材料,表明SOD活性下降及脂质过氧化作用与杂交稻抗白叶枯病相关,SOD活性在接种染病后的短时期内下降,对加速染病组织的崩溃有积极意义,也可能是植物染病后的一种应急反应。由于抗病材料较感病材料具有较高的SOD活性以及染病后抗病材料体内POX活性大幅度上升,因此,其体内清除活性氧的能力大于感病材料,这对于防止活

性氧的进一步伤害、限制病斑扩展有重要作用。

王雅平等^[15]发现小麦健株体内 SOD 活性与小麦抗赤霉病呈显著正相关, 我们的研究结果也初步表明, 杂交稻体内 SOD 活性与其抗白叶枯病有正相关性, 这一发现尤其需要进一步扩大试验材料加以验证, 如验证是实, 将为杂交稻抗病育种提供一个侵染前生化指标, 不须接种便可对新材料进行抗病性筛选, 可略去大量繁重的接种程序, 并可减免接种误差, 提高杂交稻抗病育种效率。

参考文献

- 1 刘成远, 李中奎, 权明清等. 水稻抗白叶枯病毒毒素细胞无性变异系的初步筛选. 武汉植物学研究, 1994, 19(1):1-6
- 2 章琦, 施爱农, 王春莲等. 9个水稻品种对白叶枯的抗性遗传研究. 作物学报, 1994, 20(1):84-92
- 3 薛应龙, 欧阳光察, 澳绍根. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 IV. 水稻幼苗 PAL 活性的动态变化. 植物生理学报, 1983, 9(3): 301-305
- 4 林植芳, 李双顺, 林桂株等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 1984, 26(6):605-615
- 5 白玉璋, 王景安, 孙玉霞等编. 植物生理学测试技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1993, 99
- 6 庄炳昌, 徐豹, 廖林. 接种大豆花叶病毒后, 大豆叶片超氧化物歧化酶、过氧化物酶和蛋白组分的变化. 植物病理学报 1993, 23(3):261-265
- 7 薛应龙. 苯丙氨酸解氨酶在植物抗病中的作用. 中国生化学会专题讨论会文集(3)—农业生物化学, 北京: 科学出版社, 1986, 34-50
- 8 李冠, 欧阳光察. 植物诱导抗性. 植物生理学通讯, 1990, (6):1-5
- 9 杜良成, 王豹. 病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用. 植物生理学通讯, 1990, (4):1-6
- 10 Vidyasekaran P ed. Physiology of Disease Resistant in Field Crop. Today & Tomorrow Printer Publishers, 1990, 11-23
- 11 Smith C J ed. Biochemistry and Molecular Biology of Plant-pathogen Interaction. Oxford: Oxford Scie Publisher, 1991, 126-143
- 12 Keppler L D, Novacky A. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1987, 30:233-245
- 13 Keppler L D, Baker C J. O-Initiated lipid peroxidation in a bacterial-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. Phytopathology, 1989, 79:555-562
- 14 Croft K P C, Voisey C R, Slusarenko A J. Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1990, 36:49-62
- 15 王雅平, 吴兆苏, 刘伊强. 小麦抗赤霉病性的生化研究及其机制的探讨. 作物学报, 1994, 20(3):327-333