

灰斑病菌入侵对不同抗性玉米 品种保护酶活性的影响

王桂清, 赵培宝, 杜学林, 邢光耀

(聊城大学 农学院, 山东 聊城 252059)

摘要: 为从分子生物学角度进一步揭示玉米对灰斑病抗性的生理机制提供理论依据, 利用紫外可见分光光度计, 采用比色(酶活测定)法, 研究了玉米灰斑病菌侵入对不同抗性玉米品种保护酶活性的影响。结果表明, 玉米灰斑病菌侵入后不同抗性玉米品种体内的保护酶活性均发生一定的变化: POD 活性增加、CAT 活性降低, 酶活增加(或降低)的幅度和提高(或降低)率与寄主的抗感性关系不密切; EST 活性提高, 抗病品种酶活增加的幅度和提高率比感病品种高; SOD 活性增加, 且感病品种 SOD 酶活增加的幅度比抗病品种高; PPO 活性增加, 感病品种酶活提高率较高, 而中抗和高抗病品种酶活提高率较低。说明玉米在遭到病菌侵入时, 体内会产生相应的反应来减轻危害。

关键词: 玉米品种; 玉米灰斑病菌; 保护酶

中图分类号: S435.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)03-0149-05

The Effect of Invasion by the Gray Leaf Spot Pathogen on Protective Enzymes Activity in Different Corn Resistant Varieties

WANG Gui-qing, ZHAO Pei-bao, DU Xue-lin, XING Guang-yao

(College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: It indicated that when corn was hurt, the body would develop appropriate response to mitigate damage. Using the method of chromometry by ultraviolet-visible spectrophotometer, the effect on the activity of protective enzymes in different resistant maize varieties infected by the gray leaf spot pathogens were analyzed. The results showed that the activity of some protective enzymes changed, including: the activity of POD was increased, the activity of CAT was decreased, both changes of the two enzyme activity were not related with the host resistance; the activity of EST was increased, furthermore both the increase rate and extent of the enzyme activity in disease-resistant varieties were higher than that in susceptible varieties; the activity of SOD was increased, the increase rate and extent of the activity in disease-susceptible varieties were higher than that in resistant varieties; the activity of PPO was increased, the elevation rate of the PPO activity in susceptible varieties were higher, rather than in middling and high disease-resistant varieties.

Key words: Corn varieties; Corn gray leaf spot pathogens; Protective enzymes

在寄主-病原物互作中, 受病原物诱导, 可引起寄主体内病组织或邻近组织中生物活性酶的改变。关于寄主植物受病原物侵染后体内相关酶活性的变化已有大量研究, 涉及的植物有水稻、马铃薯、菜豆、辣椒、黄瓜、苹果、烟草、棉花、线麻、杨树等, 涉及的酶有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、苹果酸脱氢酶、琥珀脱氢酶、几丁质酶等^[1, 2]。植株体内上述酶的活性变化与植物抗病性具有一定的相关性。

玉米灰斑病(*Cercospora zea-maydis* Tehon & Daniels)是一种以为害叶片为主的病害, 近年来, 已在华北和东北玉米产区普遍发生, 局部地区成灾^[3, 4]。本试验采用比色法对玉米灰斑病菌入侵对不同抗性玉米品种保护酶系的影响进行了研究, 该研究对玉米灰斑病的发生规律和防治措施、病原菌的变异和致病机制、植物保护酶系在抵抗逆境时的作用等都具有十分重要的意义, 该研究也为从分子生物学角度进一步揭示玉米对灰斑病抗性的生理机制提供理论依据。

收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 山东省中青年科学家科研奖励基金(2006BS06015); 山东省教育厅科学技术项目(J06N01)

作者简介: 王桂清(1968-), 女, 黑龙江北安人, 教授, 博士, 主要从事植物保护的教学与科研工作。

1 材料和方法

1.1 供试品种与种植

选择抗感性不同的聊城地区主栽玉米品种为材料,感病品种为聊玉 93-1、莱农 14、DH3707、农大 108、郑单 958(感病程度依次减弱),抗病品种为 LD984、LD981、金海 702、LD661、东单 60(抗病程度依次增强)。

选择土质一致的试验地,划分 2 个小区,每个小区内的 10 个品种随机排列,每一个品种 5 行、3 排,常规管理。

1.2 菌株的分离及培养

玉米灰斑病病样于 2006 年采自辽宁省沈阳地区的感病品种铁单 19,采用单病斑组织分离和单胞分离的方法,得到纯化菌株 06-09。利用玉米叶煎汁平板培养基进行培养。

1.3 接种方式与取样

当试验田里的玉米长到喇叭口期时,采用菌液灌心的方法接种^[5],菌液浓度为 $3.2 \times 10^7 \sim 4.8 \times 10^7$ 孢子/mL,每株约灌 5 mL。一个小区接种,另一个小区作为对照。

接种 20 d 寄主发病后,分别采取每个品种的病叶和对照组的健康叶片进行试验。

1.4 酶活测定

1.4.1 酶粗提液的制备 准确称取 1.0 g 玉米叶片的鲜样,按 1: 5(*m/V*)加入 0.2 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液,冰浴研磨成匀浆,转入离心管。搅动 5 min 后置于 4℃下放置 2 h,取出后以 8 000 g 在 4℃下高速离心 20 min,上清液即为粗酶提取液,4℃冰柜中保存。

1.4.2 蛋白含量及保护酶活性的测定 蛋白含量采用考马斯亮兰 G-250 染色法;过氧化物酶(POD)活性测定参照李合生^[6]的方法;过氧化氢酶(CAT)活性测定参照张宪政^[7]的方法;酯酶(EST)活性测定按高增贵等^[8]方法;超氧化物歧化酶(SOD)活性采用 NBT 光化还原法^[9]测定;多酚氧化酶(PPO)的活性按李靖等^[10]方法进行。

1.5 数据分析方法

试验结果采用 Microsoft Excel 软件进行数据整理,数据线性回归由 SPSS 完成(SPSS 10.0);差异显著性分析依据 Duncar 新复极差法,由 DPSv3.01 专业版完成。

2 结果与分析

2.1 对过氧化物酶(POD)活性的影响

玉米灰斑病菌侵入寄主后,不同抗性玉米品种 POD 活性的变化情况如图 1 所示。

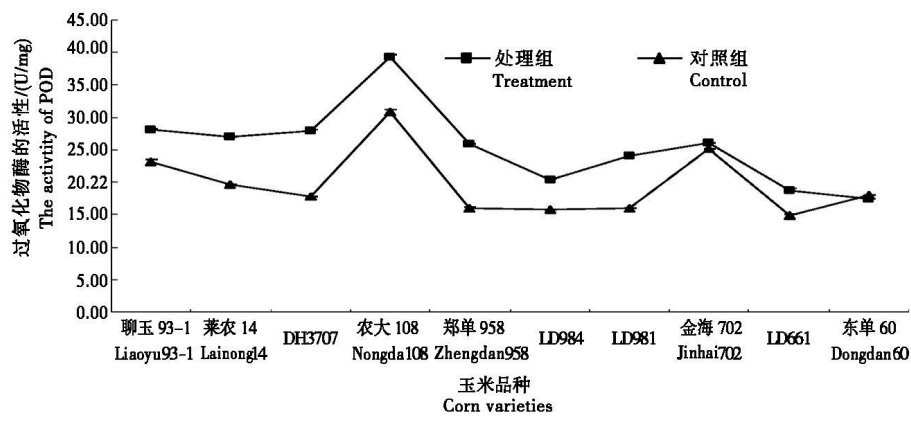


图 1 灰斑病菌入侵对 POD 活性的影响

Fig. 1 Effect on the activity of the POD after gray leaf spot bacteria invaded

由图 1 可以看出,玉米灰斑病菌侵入后,不同抗性的玉米品种与对照比较,POD 活性均发生一定的变化,感病品种和中抗品种表现为酶活增加,酶活增加了 0.946 7~ 10.046 9 U/mg,提高率为 3.773 3%~ 62.176 7%,其中感性品种郑单 958 酶活提高最多,酶活增加了 9.920 1 U/mg,提高率为 62.176 7%,其次为 DH3707、LD981、莱农 14、LD984、农大 108、LD661、聊玉 93-1 和金海 702 等玉米品种,酶活提高率分别为 56.277 9%, 50.341 7%, 38.062 8%, 28.480 4%, 27.245 6%, 25.774 4%, 21.349 9% 和

3.773 3%,这 9 个品种的 POD 酶活提高率的差异性达到极显著;玉米灰斑病菌侵入后,高抗品种东单 60 的 POD 活性稍有降低,降低了 0.522 1 U/mg,酶活降低率为 2.916 5%。总体看,玉米灰斑病菌侵入后,寄主 POD 活性增加,但酶活增加的幅度和提高率与寄主的抗感性关系不密切,但抗和高抗品种酶活增加较少。

2.2 对过氧化氢酶(CAT)活性的影响

玉米灰斑病菌侵入寄主后,不同抗性玉米品种 CAT 活性的变化情况如图 2 所示。

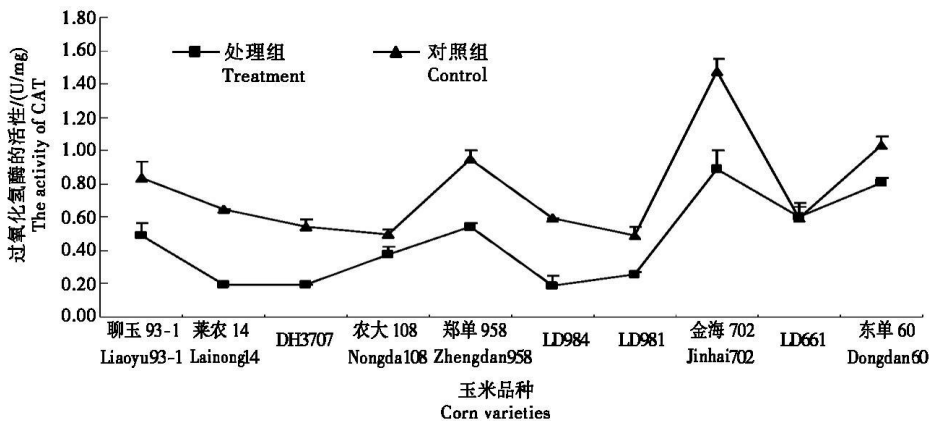


图 2 灰斑病菌入侵对 CAT 活性的影响

Fig.2 Effect on the activity of the CAT after gray leaf spot bacteria invaded

由图 2 可以看出,与对照比较,玉米灰斑病菌侵入后,绝大多数品种表现为酶活降低,酶活降低了 0.121 6~ 0.587 5 U/mg,降低率为 21.526 1%~ 69.977 4%,其中感性品种莱农 14 酶活降低最多,酶活降低了 0.450 8 U/mg,降低率为 69.977 4%,其次为 LD984、DH3707、LD981,郑单 958,聊玉 93-1,金海 702,农大 108 和东单 60 等玉米品种,酶活降低率分别为 69.119 7%, 63.137 5%, 47.334 0%, 42.435 9%, 41.715 4%, 39.937 1%, 24.692 4% 和 21.526 1%,这 9 个品种的 CAT 酶活降低率的差异性不显著;玉米灰斑病菌入侵后,抗性品种 LD661 的 CAT 活性稍有增加,增加了 0.004 3 U/mg,酶活提高率为 0.574 8%。

从品种的抗感性上看,灰斑病菌侵入后,感病品种 CAT 活性均降低;但抗病品种 CAT 活性有的降低率较高,如中抗品种 LD984,降低率为 69.119 7%,有的抗病品种 CAT 活性降低率较低,如东单 60,降低率为 21.526 1%,有的抗病品种,灰斑病菌侵入后,CAT 活性反而增加,如抗病品种 LD661,酶活提高率为 0.574 8%。总体看,玉米灰斑病菌侵入后,寄主 CAT 活性降低,酶活降低的幅度和降低率与寄主的抗感性无关。

2.3 对酯酶(EST)活性的影响

玉米灰斑病菌侵入寄主后,不同抗性玉米品种 EST 活性的变化情况如图 3 所示。

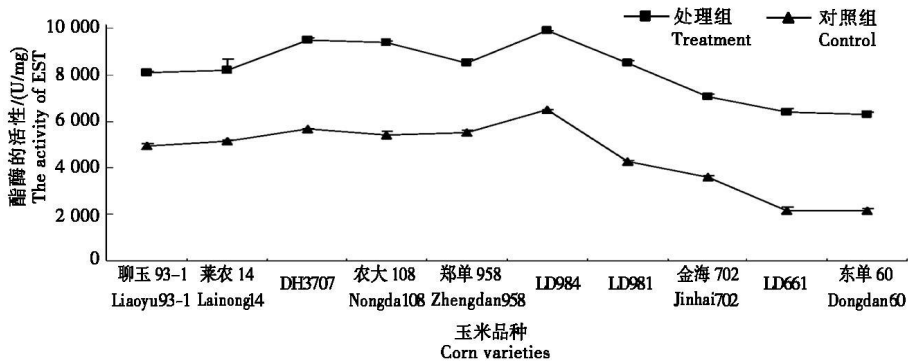


图 3 灰斑病菌入侵对 EST 活性的影响

Fig.3 Effect on the activity of the EST after gray leaf spot bacteria invaded

由图 3 可以看出,玉米灰斑病菌侵入后,不同抗性的玉米品种与对照比较,EST 活性均表现为增加,酶活增加了 2 987.059 9~ 4 270.636 7 U/mg,提高率为 52.274 6%~ 199.375 1%,其中抗性强的品种 LD661 和东单 60 酶活提高多,提高率分别为 200.713 0% 和 190.713 0%。从品种的抗感性上看,灰斑病菌侵入后,抗性程度高的品种 EST 活性提高率较高,如东单 60、LD661、金海 702 和 LD981,提高率在 95% 以上,LD984 的提高率为 52.274 6%,5 个

抗病品种的 EST 酶活提高率存在显著差异;感病品种 EST 活性提高率较低,为 54.293 5%~ 73.331 0%,5 个感病品种间 EST 酶活提高率的差异性不显著。总体看,玉米灰斑病菌侵入后,寄主 EST 活性均提高,抗病品种酶活增加的幅度和提高率比感病品种高。

2.4 对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

玉米灰斑病菌侵入寄主后,不同抗性玉米品种 SOD 活性的变化情况如图 4 所示。

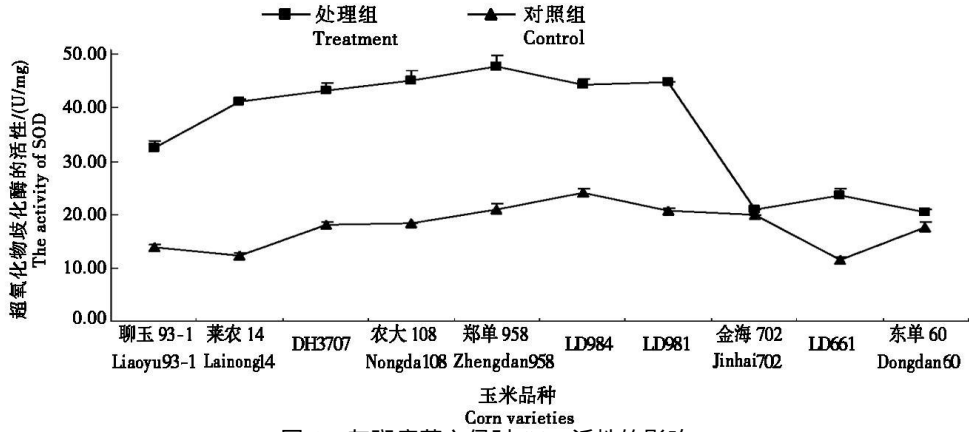


图 4 灰斑病菌入侵对 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect on the activity of the SOD after gray leaf spot bacteria invaded

由图 4 可以看出,与对照比较,玉米灰斑病菌侵入后,不同抗性的玉米品种 SOD 活性均表现为酶活增加,酶活增加了 0.896 2~ 28.877 7 U/mg,提高率为 4.485 4%~ 235.683 1%,其中感性品种莱农 14 酶活提高最多,酶活增加了 28.877 7 U/mg,提高率为 235.683 1%,其次为农大 108、DH3707、聊玉 93-1、郑单 958、LD981、LD661、LD984 和东单 60 等玉米品种,酶活提高率分别为 145.083 3%、140.229 3%、136.629 3%、128.056 3%、117.367 2%、103.912 1%、83.273 7%和 17.751 0%,抗病品种金海 702 酶活提高最低,提高

率为 4.485 4%,10 个品种的 SOD 酶活提高率存在显著差异。从品种的抗感性上看,灰斑病菌侵入后,感病品种 SOD 活性提高率较高,均在 128% 以上;抗病品种 SOD 活性提高率较低,均在 117% 以下。总体看,玉米灰斑病菌侵入后,寄主 SOD 活性增加,且感病品种 SOD 酶活增加的幅度偏高,而抗病品种 SOD 酶活增加的幅度偏低。

2.5 对多酚氧化酶(PPO)活性的影响

玉米灰斑病菌侵入寄主后,不同抗性玉米品种 PPO 活性的变化情况如图 5 所示。

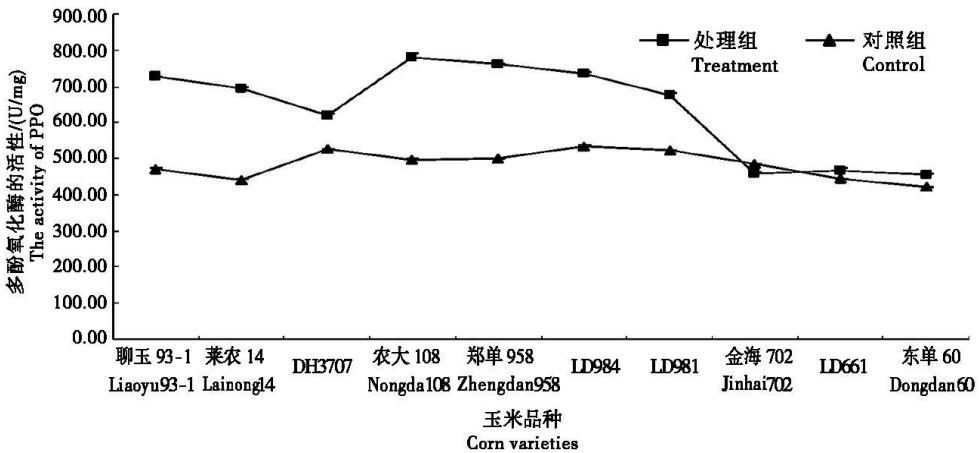


图 5 灰斑病菌入侵对 PPO 活性的影响

Fig. 5 Effect on the activity of the PPO after gray leaf spot bacteria invaded

由图 5 可以看出,与对照比较,玉米灰斑病菌侵入后,不同抗性的玉米品种 PPO 活性主要表现为酶活增加,酶活增加了 25.744 9~ 284.213 7 U/mg,提高率为 5.813 6%~ 57.630 7%,其中感病品种莱农 14 酶活提高最多,酶活增加了 253.963 6 U/mg,提高率为 57.630 7%,其次为农大 108、聊玉 93-1、郑单 958、LD984、LD981、DH3707、东单 60 和 LD661 等玉米品种,酶活提高率分别为 57.114 3%、54.497 4%、52.846 7%、37.611 5%、28.877 6%、18.075 9%、7.910 5%和 5.813 6%,这 9 个品种的 PPO 酶活提高率的差异

性分别为莱农 14 和农大 108 的差异不显著,其余品种的差异性达到极显著;抗性品种金海 702 的 PPO 活性稍有降低,降低了 24.681 2 U/mg,酶活降低率为 5.101 4%。总体看,玉米灰斑病菌侵入后,寄主 PPO 活性增加,感病品种 PPO 酶活提高率较高,而中抗和高抗病品种 PPO 酶活提高率较低。

3 结论与讨论

利用紫外可见分光光度计,采用比色(酶活测定)法,研究了玉米灰斑病菌侵入对不同抗性玉米品

种保护酶活性的影响。结果表明, 玉米灰斑病菌侵入后不同抗性玉米品种体内的保护酶活性均发生一定的变化: POD 活性增加、CAT 活性降低, 酶活增加(或降低)的幅度和提高(或降低)率与寄主的抗感性关系不密切; EST 活性提高, 抗病品种酶活增加的幅度和提高率比感病品种高; SOD 活性增加, 且感病品种 SOD 酶活增加的幅度比抗病品种高; PPO 活性增加, 感病品种酶活提高率较高, 而中抗和高抗病品种酶活提高率较低。说明玉米在遭到灰斑病菌侵入时, 体内会产生相应的反应来减轻为害。

植物体在受到病原菌侵染时常发生活性氧迸发现象, 植物抗病过程中产生的 H_2O_2 对病原菌有杀伤或抑制作用。但是多余的活性氧影响植物的正常生理活动, 最终导致细胞死亡, 而 POD、CAT 和 SOD 等正是负责清除活性氧的保护酶。抗病植株在受到病原菌侵染后还可快速促进酚类化合物的合成, PPO 则能将些酚类物质氧化成对病原菌有毒的醌类物质, 以抵抗病原菌的侵染和扩展^[11]。酯酶存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中, 由于它们能水解非生理存在的酯类化合物, 包括一些药物, 因此认为可能对植物有去毒作用, 与植物的抗逆性有一定的关系。Jennings 等^[12]分析了玉米敏感型和抗病型受 *Helminthosporium carbonum* 感染后保护酶的变化发现, POD 活性都提高, 敏感型更高些, 抗病型寄主 PPO 活性不变, 而敏感型的植株 PPO 的反应与 POD 类似; 邢会琴等^[13]研究了 POD 等与苜蓿白粉病抗性的关系指出, 抗病品种的 POD 活性显著低于感病品种; 感病后, 感病品种的酶活性升高幅度明显大于抗病品种。营金凤等^[14]研究了不同品种棉株感染红腐病菌后 SOD 等 3 种酶活性动态变化指出, 棉株受红腐病菌侵染后, 体内 PPO、POD、SOD 3 种酶活性均显著增加, 抗病品种中棉 29 的 3 种酶活性均高于感病品种泗棉 3 号, 而且前者酶活提高的速度快于后者。刘学敏等^[15]研究了抗病性不同的烟草品种 CV87 和 NC89 接种赤星病菌后 POD、CAT 等保护酶活性变化情况指出, 抗病品种 CV87 随接种叶位升高 POD 与 CAT 活性增加, 感病品种 NC89 表现先升高后降低的趋势, 无论接种与否 NC89 的 POD 活性都高于 CV87, 抗病品种 CV87 的 CAT 活性高于感病品种。王兴福等^[16]研究了抗、感霜霉病两类黄瓜品种感染霜霉病菌后叶内 SOD、PPO 和 POD 活性的变化, 结果表明, 定位叶片接种感染霜霉菌后, 随接种时间的延续, PPO 活性降低, 而 POD 活性增加, SOD 活性呈先降后升趋势, 但前两种酶活性始终是抗病品种高于感病品种, 与抗病性呈正相关, SOD 活性始

终是感病品种高于抗病品种, 与抗病性呈负相关。郑翠明等^[17]研究了不同种粒抗性大豆品种感染 SMV 后种皮 POD、SOD 活性的变化, 结果表明抗斑驳品种东农 81-43 和铁 6915 健株种皮 POD 活性显著高于感斑驳品种合丰 25、丰收 12, 说明大豆种皮 POD 活性与种粒抗性密切相关; 抗斑驳品种健株种皮 SOD 活性平均值略高于感斑驳品种。

本研究结果中, 玉米感染灰斑病菌后 POD、SOD 等活性发生了变化, 说明玉米感病过程中确实发生了活性氧的毒害作用。不同品种接种灰斑病菌后引起了活性氧的积累, 诱导了防御酶活性的增强。本研究所采用的试材具有一定的代表性, 但此结果是否适于所有品种, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨家书, 于泉林, 曹远银, 等. “铁春 1 号”小麦耐白粉病机制研究[J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 227–232.
- [2] Oogoi R, Singh D V, S Vasta V a K D. Phenols is a biochemical basis of resistance in wheat against kemal burt [J]. Plant Pathology, 2001, 50: 470–476.
- [3] 王桂清, 陈捷. 玉米灰斑病抗性研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 418–422.
- [4] 孙成韬, 张丽颖, 王金君, 等. 玉米灰斑病的研究进展[J]. 玉米科学, 2007, 15(2): 133–136.
- [5] 王桂清, 陈捷. 玉米灰斑病菌人工接种方法[J]. 玉米科学, 2006, 14(6): 148–150.
- [6] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 146–147.
- [7] 张宪政. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994.
- [8] 高增贵, 陈捷, 刘军华, 等. 拮抗内生细菌 B20-006 菌株对玉米主要防御酶系的影响[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 102–104.
- [9] 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 371–372.
- [10] 李靖, 利容千. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 277–283.
- [11] 周威, 李彩霞, 王飞, 等. 白粉病菌入侵对不同抗性南瓜品种的病理和生理影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(6): 1711–1715.
- [12] Jennings P H. Peroxidase and polyphenol oxidase activity associated with *Helmintho-sporium* leaf spot of maize[J]. Phytopathology, 1969, 59(7): 963.
- [13] 邢会琴, 李敏权, 徐秉良, 等. 过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶与苜蓿白粉病抗性的关系[J]. 草地学报, 2007, (4): 376–380.
- [14] 营金凤, 潘月敏, 高智谋, 等. 不同品种棉株感染红腐病菌后 SOD 等 3 种酶活性动态变化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 467–470.
- [15] 刘学敏, 陈宇飞, 董长军. 烟草对赤星病菌的抗性与其防御酶系活性的关系[J]. 烟草科技, 2003, 15(1): 435–440.
- [16] 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): 92–98.
- [17] 郑翠明, 滕冰, 高凤兰, 等. 感染 SMV 后大豆种皮超氧化物歧化酶过氧化物酶和多酚氧化酶的变化[J]. 中国农业科学, 1999, 32(1): 99–101.