

低浓度玉米小斑病菌 T 毒素对玉米叶片 苯丙氨酸解氨酶活性的诱导研究

马春红¹, 李运朝¹, 董文琦², 翟彩霞³, 范尉尉^{1,4}, 柳斌辉^{1,4}, 王立安⁴, 任会芳⁵

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省农林科学院, 河北 石家庄 050051;

3. 河北省农林科学院农业资源环境研究所, 河北 石家庄 050051; 4. 河北师范大学生命科学院, 河北 石家庄 050016;

5. 石家庄农业学校, 河北 石家庄 050041)

摘要: 分别用系列低浓度玉米小斑病菌 T 小种毒素处理玉米叶片后再接高浓度毒素观察其病斑大小, 并测定了与抗病相关的关键酶——苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化, 从而确定了低浓度 T 毒素能够作为激发子来诱导玉米的系统获得性抗性具有一定的广泛性, 且不同的品种所需的最适合浓度不同。对 TB37 的处理中 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组处理效果最好, PAL 酶活性最高; 而对 TMo17 的处理中 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组处理效果最好, PAL 酶活性最高。

关键词: 玉米小斑病菌; T 小种; 毒素; 苯丙氨酸解氨酶; 诱导抗性

中图分类号: S513.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0040-04

Initiatory Discuss on Induced Resistance by the Filtration of *Bipolaris maydis* Race T Toxin Cultivation

MA Chur hong¹, LI Yurr chao¹, DONG Werr qi², ZHAI Car xia³, FAN Weir wei^{1,4},
LIU Birr hui^{1,4}, WANG Li an⁴, REN Hui fang⁵

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences,

Shijiazhuang 050051, China; 2. Hebei Academy of Agriculture and

Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 3. Institute of Resources and Environment, Hebei Academy of

Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 4. College of Life Science, Hebei Normal University,

Shijiazhuang 050016, China; 5. Hebei Shijiazhuang Agriculture School, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: The low concentration of *Bipolaris maydis* race T toxin as an elicitor is extensive and can be repeatable. We detained the same results on CMS-TB37 and CMS-TMo17 lines. At the same time, we measured the dimension of the leaf spot and determined the changes of PAL activities. Accordingly, the right concentration of different breeds is discriminative. The effect of 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in different disposal of TB37 is better, but in TMo17 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is.

Key words: *Bipolaris maydis*; Race T; Toxin; PAL; Induced resistance

病原菌引起的病害一直是育种学家及科学工作者关注的焦点。如何通过诱导使植物获得抗病性和抑制病原菌的致病性已成为广泛关注的热点。而作为激发子的生物因子是迄今为止最为安全有效的“绿色诱导子”。病原菌的培养滤液不用病原菌接种, 而用其滤液预处理植物同样能诱导植物抗病。2 种大麦白粉病菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) 的粗提液能保护大麦抗白粉病, 减少白粉菌定殖数目达

40%~69%^[1]。滤液处理大麦后, 用 Northern blot 检测抗病基因转录水平(mRNA)时发现, 处理 2 h, 有 3 种基因转录开始增加。把瓜类炭疽病菌接种于马铃薯液体培养基, 振荡培养后得到菌丝团和滤液, 制成胞壁诱导物 EW 和滤液诱导物 EL, 然后喷洒在哈密瓜(炮台红)上, 哈密瓜就明显增强了对炭疽病的抗性^[2-4]。而采用玉米小斑病菌 T 小种产生的专化性毒素诱导玉米的抗病性并未见报道, 翟彩霞等研究

收稿日期: 2006-10-21

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(C2006000744); 河北省农林科学院资助项目(A03-2-01-14)

作者简介: 马春红(1968-), 女, 浙江金华人, 副研究员, 主要从事作物抗病生理及遗传育种方面的研究工作

通讯作者: 翟彩霞(1977-), 女, 河北张家口人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物营养研究工作

王立安(1965-), 男, 河北定兴人, 教授, 博士, 主要从事真菌生化与分子生物学研究。

表明低浓度的玉米小斑病菌 T 小种毒素能作为激发子来提高玉米 C103 品种的抗病性^[5,6], 本试验采用相同方法对玉米不同的品种进行预处理来确定玉米小斑病菌 T 小种毒素作为激发子有一定的广泛性。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米材料基因型为 Mo17 的 T 不育细胞质 (CMS-TMo17) 及其同核保持系 NMo17; 基因型为 B37 的 T 不育细胞质 (CMS-TB37) 及其同核保持系 NB37 均由河北省农科院遗传生理研究所提供。

选饱满玉米种子, 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min, 蒸馏水反复冲洗后, 在 28℃ 恒温培养箱中浸泡 24 h, 26℃ 催芽 2 d, 待胚根长至 1 cm 左右, 选取生长一致的籽粒种于花盆中土培。培养温度 28℃, 每天光照 12 h, 三叶一心期的幼苗用作试验材料。

1.2 毒素的制备

将玉米小斑病菌 T 小种接种在 Fries 液体培养基中, 25℃ 恒温黑暗静止培养 15 d。过滤获得毒素滤液, 保存在 4℃ 冰箱内备用^[7,8]。

1.3 毒素活性检测

将 HMT 毒素滤液用甲醇稀释配制成系列浓度 (0.001, 0.005, 0.025, 0.05 μg/mL), 并分别检测其活性 (采用离体叶片法)。

用低浓度玉米小斑病菌 T 毒素分别处理 Mo17 和 B37 的不育系及保持系的玉米叶片。用这一系列的低浓度 HMT 毒素分别处理三叶一心期玉米的第 3 叶片, 即用其涂在玉米的叶背, 连续涂 2 d, 用蒸馏水处理作为对照。2 d 后分别把相应处理的同位置叶片, 剪为大小一致的 3 段, 置于铺有湿滤纸的 12 cm × 12 cm 的培养皿内, 并接高浓度毒素 (1:20) 后放入人工气候培养箱内, 在 27℃ 恒温培养箱内, 光照、黑暗各 12 h 的条件下培养 5 d 后观察^[7,8]。

1.4 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性测定

取经低浓度滤液处理 2 d 后的玉米叶片, 接高浓度滤液 (原液稀释成 1:20) 的玉米叶片 0.15 g, 加 5 mL 含 5 mmol/L 的巯基乙醇的硼酸缓冲液, 0.2 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。少量石英砂在研钵中冰浴研磨, 在 4℃ 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液为酶粗提液。取 1 mL 酶液加 1 mL 0.02 mol/L L-苯丙氨酸, 2 mL 蒸馏水, 总体积为 4 mL; 对照加 1 mL L-苯丙氨酸, 3 mL 蒸馏水, 反应液置恒温水浴 30℃ 保温, 0.5 h 后用 752 分光光度计在 290 nm 处进行吸收测定, 以每小时在 290 nm 处吸收变化 0.01 (OD) 所需酶量为一个单位^[6]。

2 结果与分析

2.1 采用离体叶片法检测各浓度滤液的活性

用低浓度毒素处理再接高浓度毒素后玉米叶片上的病斑情况: 用 0.001, 0.005, 0.025, 0.05 μg/mL 不同浓度玉米小斑病菌 T 小种毒素处理的 CMS-TMo17 各叶片病斑面积为 9~12 mm², 小于对照的病斑面积 (65 mm²)。而对于 NMo17 则效果并不显著。经玉米小斑病菌 T 毒素处理的 CMS-TB37 叶片病斑面积为 4~27 mm², 小于对照的病斑面积 (68 mm²)。对于 NB37 来说, 效果同样不是很显著。此结果表明: 从宏观上我们可以确定低浓度的 T 毒素可以作为激发子来提高不同玉米品种雄不育系的诱导抗病性。

2.2 不同稀释倍数的培养滤液对 PAL 酶活性的影响

PAL 作为苯丙烷类代谢途径的关键酶, 可以通过低浓度 T 毒素预处理而激活。

从图 1 看出, CMS-TMo17 玉米叶片中的 PAL 活性均高于同类叶片未经过低浓度毒素预处理的对照。经预处理的叶片, 均在 24 h 时 PAL 活性达到高峰, 随后保持平稳; 而经 0.001 μg/mL 预处理的叶片在 48 h 时 PAL 酶活性达到高峰, 此后保持平稳。例如: 0.05 (T) 组处理效果是最好的, 0~96 h 内的动态检测, PAL 酶活性比对照平均提高了 76.9%。同时进行 t 检验, 各处理与对照相比, 差异极显著 (p < 0.01)。

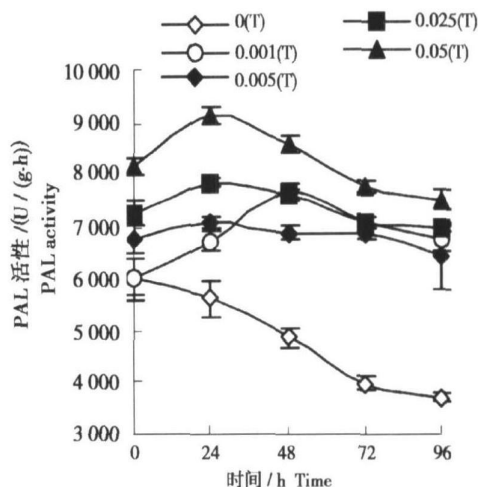


图 1 T 毒素 (培养滤液) 处理 TMo17

细胞质玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig 1 The changes of PAL activities of TMo17 cytoplasm leaves treated by *Bipolaris maydis* race T cultivation

从图 2 看出, CMS-TB37 经几种处理后, 其叶片活性变化比较平稳, 没有出现高峰, 但与对照相比, PAL 酶活性一直保持在一定水平, 并没有在接高浓度毒素后, 出现明显的下降趋势。例如: 0.025 (T) 组

处理效果是最好的, 0~96 h 内的动态检测, PAL 酶活性比对照平均提高了 83.2%。同时进行 t 检验, 各处理与对照相比, 差异极显著 ($p < 0.01$)。从以上数据看出, 经处理后的 TB37 叶片 PAL 酶活性虽没有大幅度提高, 但低浓度毒素大大减缓了叶片中 PAL 酶活性的下降。

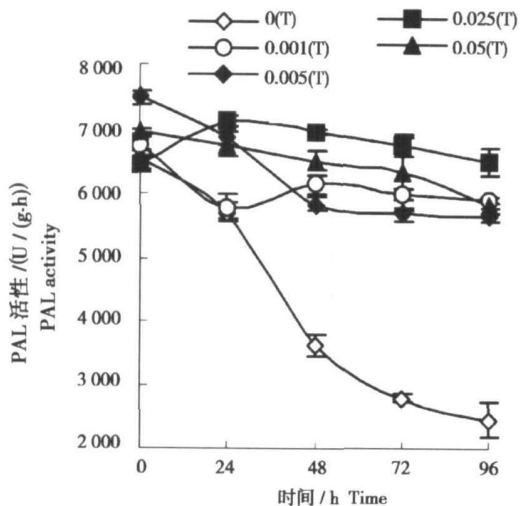


图2 T毒素(培养滤液)处理TB37细胞质玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig 2 The changes of PAL activities of TB37 cytoplasm leaves treated by *Bipolaris maydis* race T cultivation

如图1和图2所示, 低浓度毒素同样可以作为激发子来诱导提高 CMS-TMol17 和 CMS-TB37 叶片 PAL 的活性。

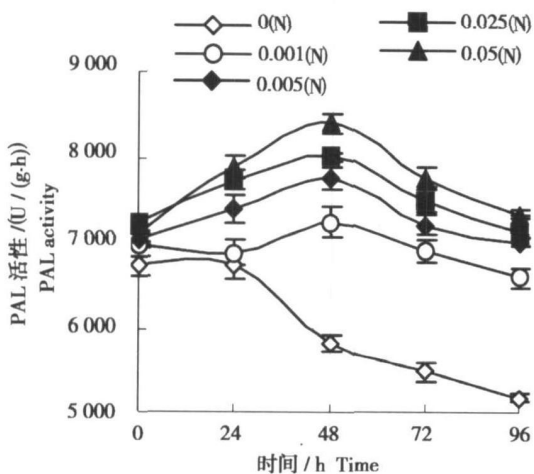


图3 T毒素(培养滤液)处理NMol17细胞质玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig 3 The changes of PAL activities of NMol17 cytoplasm leaves treated by *Bipolaris maydis* race T cultivation

NMol17 经预处理后, 0~96 h 内的动态检测, 在 48 h 时, PAL 酶活性均达到高峰, 而对照叶片在接高浓度毒素后, PAL 酶活性出现明显的下降趋势。同时进行 t 检验, 各处理与对照相比, 差异显著 ($p < 0.05$)。NB37 经预处理后, 0~96 h 内的动态检测,

PAL 酶活性变化比较平稳, 没有出现高峰, 但与对照相比, 差异显著 ($p < 0.05$) (图 3, 4)。说明, 低浓度毒素在一定范围内可以作为激发子来诱导提高 NMol17 和 NB37 玉米的抗病性。

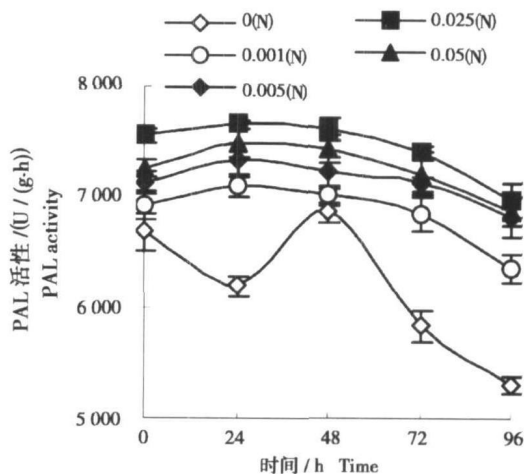


图4 T毒素(培养滤液)处理NB37细胞质玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig 4 The changes of PAL activities of NB37 cytoplasm leaves treated by *Bipolaris maydis* race T cultivation

3 讨论

苯丙氨酸类代谢是生成多种次生物质的主要途径之一, 其中许多和此代谢有关的次生物质是与植株的抗病性相关的^[9-13]。

对不同抗性的玉米品种接种后 PAL 酶活性的动态分析表明: 无论是抗病品种, 还是感病品种, 在受到病原菌侵染后, 其体内的细胞都会作出抗病反应, 表现为 PAL 酶活性的变化。对于 Mol17 来说, 经预处理的 T 细胞质, PAL 酶活性峰值出现在 24 h, 而 N 细胞质的 PAL 酶活性峰值出现在 48 h, 但最有效的激活浓度均为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而对于 CMS-TB37 和 NB37 经预处理后, PAL 酶活性变化比较平稳, 没有出现高峰, 最有效的激活浓度为 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这说明, 在不同的品种、不同的细胞质中所需激发子最有效的激活浓度及激活时间不同。因此, 低浓度毒素不仅能成功地激活 CMS-TC103 叶片的 PAL 酶活性^[6], 同时低浓度的玉米小斑病菌 T 毒素的诱导抗病性作用具有一定的广泛性。

诱导植物系统抗病性如今能被应用, 是因为它不改变植物本身的遗传性、可控性、安全无污染^[14,15], 本试验提供了叶片内部所产生的生化反应与叶片表面的抗性病理反应相吻合的直接证据。预示着在非专化病害的领域用毒素诱导植物抗病性将有更广阔的应用研究。

参考文献:

- [1] 毛国杰. 小麦品种对小麦白粉病菌侵染信号传递初探[J]. 植物生理学报, 1999, 29(4): 326–329.
- [2] 徐建华. 黄瓜不同抗性品处感染镰刀菌枯萎病的几种酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 239–242.
- [3] 冯洁. 棉株体内几种生化物质与抗枯萎之间关系的初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 291–297.
- [4] 王敬文. 植物苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫病中的作用[J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 35–42.
- [5] 翟彩霞. 玉米小斑病菌T小种毒素对玉米叶片过氧化物酶活性的诱导[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(4): 387–389.
- [6] 马春红, 翟彩霞, 王立安, 等. 玉米小斑病菌T小种培养滤液对玉米抗病性的诱导[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1578–1584.
- [7] 王立安, 马春红, 赵俊霞, 等. HMG毒素对C型不育玉米根冠细胞原生质体及微丝分布的影响[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 225–228.
- [8] 王立安, 郝丽梅, 马春红, 等. HMG毒素对雄性不育玉米线粒体结构和功能的影响[J]. 植物病理学报, 2004, 34(3): 221–224.
- [9] 崔彦玲, 张环. 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相关性[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 79–82.
- [10] 汪红, 刘辉, 袁红霞, 等. 棉花黄萎病不同抗性品种接菌前后体内酸活性及酚类物质含量的变化[J]. 华北农学报, 2001, 16(3): 46–51.
- [11] 毛爱军, 王永健, 冯兰香, 等. 疫病病菌侵染后辣椒幼苗体内保护酶活性的变化[J]. 华北农学报, 2003, 18(2): 66–69.
- [12] 高芬, 马利平, 乔雄梧, 等. 家畜沤肥浸渍液对蔬菜抗病性相关酶活性的变化及叶绿素含量的影响[J]. 华北农学报, 2003, 18(2): 60–62.
- [13] 李淑菊, 马德华, 庞金安, 等. 黄瓜感染黑星病菌后的生现变化及抗病性的产生[J]. 华北农学报, 2003, 18(3): 74–77.
- [14] 翟彩霞, 马春红, 陈霞, 等. 抗病激发子在诱导植物抗病性中的应用[J]. 华北农学报, 2003, 18(增刊): 58–61.
- [15] 翟彩霞, 马春红, 秦君, 等. 植物诱导抗病性的常规鉴定—相关酶活性变化与诱导抗病性的关系[J]. 中国农学通报, 2004, 20(5): 222–224.