

# 利用 POX 同工酶测定谷子(粟)品种对黑穗病的抗性

马建萍, 古世禄, 独俊娥, 古兆明, 刘子坚

(山西省农业科学院作物遗传研究所, 山西 太原 030031)

**摘要:** 采用箱栽方法种植 12 个抗病性不同的谷子品种, 分析了芽苗过氧化物酶(POX)活性及同工酶的变化。结果证明, 对黑穗病免疫的品种接菌后 POX 活性平均提高 22.8%。越是易感病的品种接菌后 POX 活性提高得越多。感病品种平均提高 71.6%, 高感品种平均提高 95.0%。同工酶酶谱, 免疫品种接菌后不变, 越是易感病的品种接菌后酶谱变化越大。二维排序, 免疫品种接菌与不接菌的两个点落在同一点上或附近,  $d$  值平均为 3.1。易感病品种的两点相去甚远, 其中, 感病品种平均  $d$  值 12.2; 高感品种平均  $d$  值 13.2。采用芽苗 POX 同工酶测定谷子品种抗黑穗病性, 简便快速。

**关键词:** 谷子; 芽苗; 黑穗病; 过氧化物酶同工酶

**中图分类号:** S515.034      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-7091(2001)01-0038-06

同工酶酶谱是植物体内生化特性的反映, 与植物抗病性的密切关系, 研究的资料较多。谷子同工酶的研究较少, 且内容多在分类、起源及光周期等方面<sup>[1-3]</sup>, 对 POX 的研究更少<sup>[4]</sup>。我们选用对黑穗病抗性不同的 12 个品种, 通过接菌处理, 观察其 POX 活性及酶谱的变化, 以探求测定抗黑穗病的新方法, 为加速抗病育种提供手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

选用对黑穗病抗性不同的 12 个品种, 按接菌后发病率划分: 有狗屎软谷、小黑谷、黑软谷和紧穗密码黑黄谷等免疫类型(IM)品种 4 个, 接菌发病率为 0; 有中感类型(MS)品种 1 个(软谷), 接菌发病率 20.0%; 有紫苗白、辽东黄、毛黄谷等感病类型(S)品种 3 个, 接菌发病率分别为 33.2%, 33.3% 和 34.5%; 有晋谷 10 号、晋谷 21 号、77-322 和晋汾 34 号等高感类型(HS)品种 4 个, 接菌发病率分别为 64.7%, 65.9%, 66.7% 和 60.9%。

### 1.2 分析方法

对以上材料的种子, 采用长治、太原、汾阳和黑龙江等地的混合菌粉按饱和接菌法接菌处理, 以不接菌的为对照。栽培于 56 cm × 36 cm × 19 cm 的 2 个塑料箱中, 7 月 10 日播种, 7 月

收稿日期: 2000-06-23

基金项目: “九五”国家科技攻关项目部分内容(96-002-02-09-02); 山西省农科院老年基金项目。

作者简介: 马建萍(1957-), 女, 副研究员, 学士, 主要从事谷子生理、遗传研究。古世禄为本文执笔者。

13 日出苗, 7 月 15 日将苗芽全部取出, 剪取同一部位制样, 测定 POX 活性及同工酶酶谱。

1. 2. 1 POX 活性测定 参照波钦诺克 XH<sup>[5]</sup>和朱广廉等<sup>[6]</sup>介绍的愈创木酚显色法, 以 7550 紫外—可见光分光光度计测定其 440 nm 处光密度的变化。酶活性以单位时间内每克鲜重的光密度值表示。

1. 2. 2 POX 同工酶电泳 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 电极缓冲液为 Tris—柠檬酸缓冲液, 分离胶浓度为 7. 0%, 浓缩胶浓度为 2. 5%, POX 活性染色用醋酸联苯胺显色法。

1. 2. 3 POX 同工酶酶谱二维排序, 参照阳含熙等<sup>[7]</sup>和赵立志等<sup>[8]</sup>介绍的方法进行, 酶谱相似值  $c = 2W \div (A + B) \times 100$ , 不相似值  $D = 100 - C$ ; 酶谱间的排序间距  $d = \sqrt{dx^2 + dy^2}$ ; 酶谱在  $x$  轴和  $y$  轴上的位置, 以  $x$  (或  $y$ )  $= (L^2 + D_a^2 - D_b^2) \div 2L$  计算。以上式中,  $W$  为 2 个酶谱相同酶带的条数,  $A, B$  分别为 2 个酶谱酶带的条数,  $L$  为标记在  $x$  轴或  $y$  轴上零点与端点酶谱间不相似值,  $D_a, D_b$  为某酶谱与标记在  $x$  轴或  $y$  轴上  $a, b$  点酶谱的不相似值。  $dx$  和  $dy$  为各酶谱在  $x$  轴和  $y$  轴上位置的差值。

## 2 结果与分析

### 2. 1 不同抗病性品种接菌后芽苗 POX 活性的变化

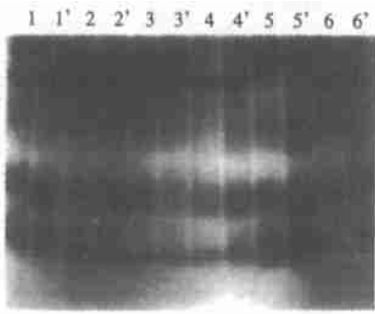
表 1 指出, 尽管不同品种间芽苗内 POX 活性差异很大, 且与抗病性关系不大。但接菌以后, POX 活性均显著增加, 其增加的程度在不同抗病性品种间有明显差别。免疫品种增加 20. 6%~ 30. 5%, 平均为 22. 8%; 感病品种增加 37. 5%~ 128. 8%; 平均为 71. 6%; 高感品种增加 64. 4%~ 132. 9%, 平均为 95. 0%。在高感品种中, 77—322 品种本身 POX 活性较高, 接菌后提高的较少, 属异常现象。中感类型中仅一个品种, 代表性不足。总的来看, 越是易感病的品种, 接菌后 POX 活性增加的越多, 有一定的规律性。接菌后 POX 总活性的变化与其同工酶的改变相联系着。

表 1 不同抗病性品种接菌后芽苗 POX 活性的变化 OD/(g·min)

抗病类型	品 种	接菌	对照	增加 (%)	抗病类型	品 种	接菌	对照	增加 (%)
IM					S	紫苗白	42. 2	30. 7	37. 5
	狗屎软谷	22. 8	18. 4	23. 9		毛黄谷	37. 9	25. 5	48. 6
	小黑谷	24. 0	19. 9	20. 6	HS				
	黑软谷	26. 1	20. 0	30. 5		晋谷 21 号	40. 9	21. 8	87. 6
	紧穗密码黑黄谷	22. 1	19. 0	16. 3		晋谷 10 号	55. 9	24. 0	132. 9
MS	软谷	40. 8	19. 2	112. 5		77—322	41. 6	38. 3	8. 6
S						晋汾 34 号	30. 9	18. 8	64. 4
	辽东黄	35. 0	15. 3	128. 6					

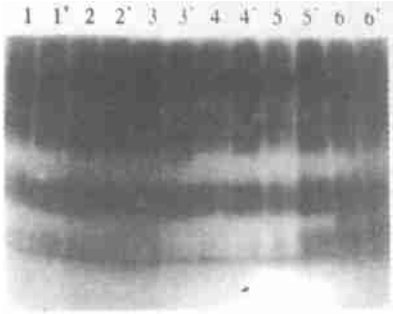
### 2. 2 不同抗病性品种接菌后 POX 同工酶酶谱的变化

由图 1 看出, 接菌以后, 免疫类型的品种 POX 同工酶酶谱没有改变, 仅是酶带的颜色略



A

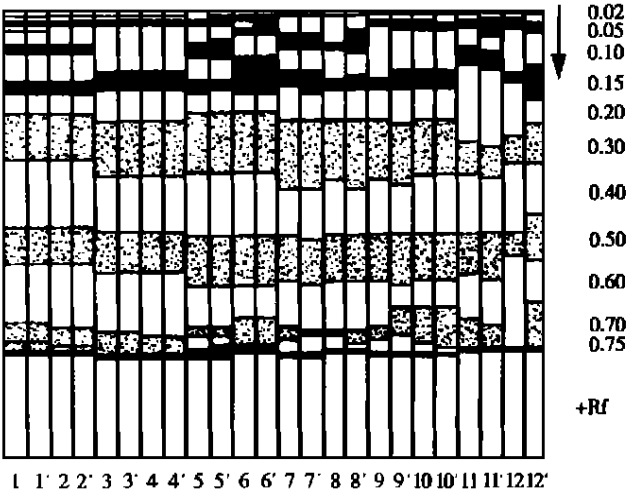
1. 狗屎软谷, 2. 小黑谷, 3. 软谷, 4. 辽东黄, 5. 77-322, 6. 晋汾 34 号, 其中标“'”的为接菌处理



B

1. 黑软谷, 2. 紧穗密码黑黄谷, 3. 紫苗白, 4. 毛黄谷, 5. 晋谷 21 号, 6. 晋谷 10 号, 其中标“'”的为接菌处理

有加深, 酶谱的相似值均为 100%,  $D = 0$ 。而易感病的品种酶谱则发生了不同的改变, 软谷在  $R_f$  值 0.02~0.04 及 0.07~0.11 处酶带加宽, 在 0.16~0.18 处酶带变窄。辽东黄在  $R_f$  值 0.02~0.06 处两带合为一带。紫苗白在  $R_f$  值 0.14~0.19 和 0.50~0.61 处酶带加宽, 在  $R_f$  值 0.71~0.73 处酶带变窄。毛黄谷在  $R_f$  值 0.05~0.10, 0.15~0.18, 0.25~0.40 和 0.71~0.72 处酶带加宽。晋谷 21 号在  $R_f$  值 0.03~0.05, 0.14~0.18, 0.50~0.61 和 0.70~0.73 处酶带加宽, 在  $R_f$  值 0.26~0.39 处酶带发生位移。晋谷 10 号在  $R_f$  值 0.14~0.18, 0.25~0.37 和 0.66~0.75 处酶带加宽, 在 0.04~0.05 处酶带变窄。77-322 在  $R_f$  值 0.03~



C

1. 狗屎软谷, 2. 小黑谷, 3. 黑软谷, 4. 紧穗密码黑黄谷, 5. 软谷, 6. 辽东黄, 7. 紫苗白, 8. 毛黄谷, 9. 晋谷 21 号, 10. 晋谷 10 号, 11. 77-322, 12. 晋汾 34 号, 其中标“'”的为接菌处理

图 1 不同抗病性品种接菌与对照 POX 同工酶酶谱

0.07, 0.50~0.60 处酶带加宽, 在  $R_f$  值 0.09~0.14, 0.30~0.38 处酶带发生位移, 在  $R_f$  值 0.70~0.75 处酶带变窄。晋汾 34 号在  $R_f$  值 0.13~0.19, 0.26~0.35 和 0.46~0.56 处酶带加宽, 在  $R_f$  值 0.19~0.21 和 0.65~0.75 处增加新的酶带, 在  $R_f$  值 0.04~0.06 处酶带发生位移。归纳而言, 中感和感病的大多数品种接菌后有 2 条带加宽, 一条带变窄。高感的大多数品种, 接菌后除颜色加深外有 3 条带加宽, 并增加 1~2 条酶带。

酶谱的不相似值计算表明, 免疫的品种接菌后酶谱不相似值  $D = 0$ , 中感品种的  $D = 37.5\%$ , 感病的品种平均,  $D = 40.0\%$ , 高感品种平均,  $D = 64.3\%$ (表 2)。越是易感病的品种接菌后酶谱不相似值越大。

表 2 不同抗病性品种接菌后同工酶酶谱不相似值(D)

抗病类型	品 种	显 带 条 数	D 值	抗病类型	品 种	显 带 条 数	D 值
IM	狗屎软谷	10	0	S	紫苗白	8	42.9
	小黑谷	8	0		毛黄谷	8	57.1
	黑软谷	7	0	HS	晋谷 10 号	7	42.9
	紧穗密码黑黄谷	7	0		晋谷 21 号	8	71.4
MS	软谷	8	37.5		77—322	7	71.4
S	辽东黄	8	20.0		晋汾 34 号	8	71.4

2.3 不同抗病性品种接菌后 POX 同工酶的二维排序

图 2 表明, 抗病性不同的品种, 接菌与对照的坐标位置差异极为明显。免疫品种特别是黑软谷、小黑谷接菌后与对照落在同一点上, 狗屎软谷的 2 个点相距较近, 酶谱的排序间距(d)为 0~3。紧穗密码黑黄谷的排序间距略大一些, 但仍小于 10, 4 个品种平均 d=3.1。感病品种接菌后与对照的点相距甚远, 酶谱间距 10.3~14.3, 平均 d=12.2, 高感品种除 77-322 异常外, 酶谱间距 12.6~13.6, 平均 d=13.2。

经效果检验, 排序间距与不相似值的相关系数,  $r=0.9364^{**}$ ,  $p>0.01$ , 排序效果极为满意。说明排序结果反映了不同抗病性品种芽苗 POX 同工酶酶谱的真实情况, 可靠性较强, 以芽苗 POX 同工酶鉴定谷子品种抗黑穗病性相当准确。只要对接菌与不接菌的酶谱进行二维排序, 抗病与感病一目了然。

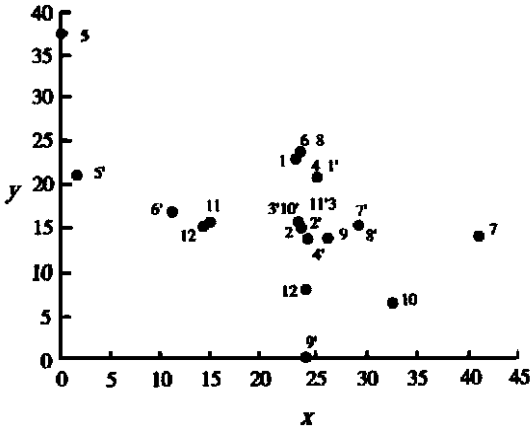


图 2 不同品种接菌与对照 POX 同工酶酶谱二维排序图(图注同图 1- C)

3 讨论

过氧化物酶是植物体内氧化系统的重要酶类。本试验证明, 对黑穗病免疫的品种, 接菌后 POX 活性提高得较少, POX 同工酶酶谱除着色外, 与对照没有区别, 感病品种接菌后, POX 活性则大幅度提高, 是免疫品种提高值的近 3 倍。同工酶酶谱中的酶带增多、加宽, 颜色加深, 越是易感病的品种酶谱的这种变化越大。这与有的报道染病后抗病品种酶带增多是不同的<sup>[4]</sup>。其原因可能与材料有关, 例如辽东黄品种在上述报道中当作抗病品种(无具体鉴定结果), 而本试验中, 接菌鉴定发病率为 33.3%, 属感病类型。

植物对病害抗感, 主要是由于控制抗病性基因表达的速度、程度和产生的抗性物质活性

不同所致。从分子水平来看,同工酶是基因表达的次级反应,其分子的大小、结构及形态差异很大。已有文献证明<sup>[9]</sup>,小麦感染白粉病后,POX 同工酶活性显著增高,并在分子量较大(28 000道尔顿以上)和较小(25 000 道尔顿以下)的地方出现 2 个高峰,小麦品种对白粉病的抗性只与一些分子量较大的 POX 活性密切相关,与分子量较小的同工酶无关。后者活性增高被认为是细胞内含物大量氧化分解的结果,仅表明其受害的程度。谷子易感黑穗病品种,接菌后 POX 活性显著提高,是否与其分子量较低的同工酶活性显著提高有关,需要进一步研究证明。

本试验证明,采用芽苗 POX 同工酶测定谷子品种对黑穗病的抗性,快速方便,从箱栽播种到获得结果只需要大约 10 d 左右,全年均可工作,不需要在田间种植,到抽穗灌浆后才能看出结果。这对加快抗病育种,筛选抗病材料具有重要意义。具体方法是:首先把种子精选后分成 2 份,一份用黑穗病饱和菌粉接菌法接菌处理,一份作为对照。然后同时播种于生长箱内,待幼芽出土,叶片尚未展开时,将芽苗全部挖出,剪取同一部位制样,进行 POX 同工酶电泳。胶片显色干燥后,分析酶谱差异,并作酶谱的二维排序。接菌与对照的两个点落在同一点或相距不远,即为抗病,否则为感病。

鸣谢:POX 同工酶电泳技术得到乔燕祥、高平平同志的帮助,POX 活性测定得到了张淑仪同志的帮助,在此一并致谢。

## 参考文献:

- [1] 高明君,陈家驹.栽培粟起源的同工酶研究[J].作物学报,1988,14(2):131-136.
- [2] 罗定泽.谷子在不同光周期下酯酶同工酶和某些生理特性的比较研究[J].武汉植物学研究,1989,7(2):167-172.
- [3] 温奎,张士遵.栽培粟过氧化物同工酶的数量分析[J].华北农学报,1990,5(3):14-19.
- [4] 刘润堂,温琪芬,乔燕祥.谷子品种抗黑穗病鉴定与同工酶分析[J].山西农业科学,1988,(11):1-3.
- [5] 波钦诺克 X H.植物生物化学分析方法[M].北京:科学出版社,1981.
- [6] 朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京大学出版社,1990.
- [7] 阳含熙,卢泽愚.植物生态学的数量分类方法[M].北京:科学出版社,1981.
- [8] 赵立志,许钢垣,李生海.遗传育种学[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [9] 杨家书,李舜芳,吴畏.小麦品种对白粉病抗性与过氧化物酶的关系[J].植物病理学报,1984,14(4):235-240.

## Study on Using Peroxidase Isoenzymes to Determine Resistance to Kernel Smut of Foxtail Millet

MA Jian-ping, GU Shi-lu, Du Jun-e, GU Zhao-ming, LIU Zi-jian

(Crop Genetics Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

**Abstract:** Peroxidase(POX) activity and isoenzyme electrophoregrams of shoots on 12 millet varieties with different resistance cultivated in plastic boxes were analysed. The results showed that after disease germ inoculation, POX activity of the immune varieties had a mean increase of 22.8%, and for sensitive varieties, the higher the sensitiveness, the higher the POX activities they got. The disease-sensitive varieties increased an average of 71.6%, and high disease-sensitive varieties increased a mean of 95.0%. For the isoenzyme zymogram of the immune ones no changes observed, while for those disease-sensitive ones, the higher the sensitiveness, the more zymogram changed. In comparison of 2-dimension ordination, two electrophoregram points of immune varieties, one of disease germ inoculated and one of the control, were at the same position, or close to each other, and average d value was 3.1. While those for the disease-sensitive ones were far apart. The mean d value of sensitive ones were 12.2 and of high sensitive ones were 13.2. It is concluded that it is a quick method to use POX isoenzyme of millet shoots to identify the resistance to kernel smut of millet.

**Key words:** Foxtail millet; Shoot; Kernel smut of millet; POX isoenzyme