

小麦抗白粉病生化标记 ——过氧化物酶 pI 6.1 酶带

王立新 苏青 康彤彤 徐民新

陈哲

(北京市农林科学院植物细胞工程实验室, 北京 100081)

(北京市农林科学院作物研究所, 北京)

摘 要 采用等电聚焦凝胶电泳比较了抗、感白粉病小麦品种的过氧化物酶同工酶酶谱, 发现抗、感品种之间的叶片过氧化物酶同工酶 pI 6.1 酶带(位于过氧化物酶同工酶等电聚焦凝胶电泳酶谱 pI 6.1)在拔节期至白粉病发生期表现水平有很大差别。抗病品种中编码 pI 6.1 酶带的基因终生正常表达, 该酶带在小麦全生育期均有较强的活性, 染色后着色深, 多属一级酶带。而该基因的表达在感病品种拔节之后受到抑制, 酶带变得模糊不清甚至消失踪迹, 多为三级、零级酶带。感染白粉病之后酶活性才回升, 再度表现为一、二级酶带。为了探索造成这一差异的原因, 比较了 119 株抗病品种与感品种杂交 F_2 代和 65 株抗病品种/感病品种//感病品种的 BC_1 代植株叶片过氧化物酶同工酶 IEF 酶谱, 证明感病品种成株的 pI 6.1 酶带活性下降是因另一隐性基因所至。

关键词 小麦 过氧化物酶同工酶 生化标记

小麦白粉病是病原菌 *Blumeria graminis* DC f. sp. *tritici* 引起的真菌病害, 由于广泛发生在世界各地的小麦产地, 被视为造成小麦减产的主要病害之一。因此白粉病抗性成为小麦新品种选育的一个重要指标。通常鉴定某品种或品系是否抗白粉病, 必须在特定的温度湿度下接种白粉病菌种, 或在特定地区根据供试材料发病程度进行抗病性评价^[1]。最近从国外引进的离体叶片接种鉴定法具有比常规鉴定法省时的优点, 但是必须在无菌条件下工作^[12]。与上述方法相比, 采用生化标记进行抗性鉴定较为简便快捷。过氧化物酶是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一, 它与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶相互协调配合, 清除过剩的自由基, 使体内的自由基维持在一个正常的动态水平, 以提高植物的抗逆性^[2]。李华琴的研究证明, 抗、感品种经接种菌种后, 叶片的过氧化物酶活性都比对照增加, 但感病品种品系的过氧化物酶活性比抗病品种品系增强的幅度大^[3]。胡广淦、李清铄对小麦抗感白粉病品种苗期、成株叶片过氧化物酶同工酶进行比较后认为, 感病品种苗期过氧化物酶同工酶带数多于抗病品种^[4]。Baga 等人的工作证明小麦叶片过氧化物酶同工酶 *poX2* 的基因是在白粉病侵染后被诱导表达的^[10]。过氧化物酶活性和同工酶数量在棉花枯萎病、玉米茎腐病、大麦黄叶病侵染作物后也会发生变化^[5~7, 11]。本文将证明抗、感白粉病的小麦品种品系之间, 叶片过氧化物酶同工酶 pI 6.1 酶带(位于过氧化物酶同工酶等电聚焦凝胶电泳酶谱 pI 6.1)在拔节期至白粉病发生期的表现水平差别很大, 可以指示小麦对白粉病的抗性, 并对造成这一差别的遗传机理进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试品种品系约 50 个,由本室第一课题组、北京市农林科学院作物所、中国农科院作物所、中国农业大学提供,其中 37 个品种品系(列于表 1 中)由中国农科院植保所小麦白粉病组进行了抗病性鉴定。抗病品种与感病品种(Yuma/Cc⁸//农大 015, CI12632/Cc⁸//京冬一号)的 4 个正、反交 F₁, 119 株 F₂ 和 65 株抗病品种/感病品种/感病品种的 BC₁ 单株,用于 pI 6.1 酶带表现机理的研究。

1.2 取样方法

样品取自于各生育期的功能叶,叶片擦净后放入-20℃保存。

1.3 电泳方法

将叶片置于 1.5 mL 离心管中挤出叶片中汁液,转移汁液到另一离心管,以 10 000 rpm 在 4℃离心 10 min,上清液作为样液进行 IEF(pH5~8)电泳分析,电泳条件为 2 000 V、5 mA、3.5 W、600 Vh、15℃(Pharmacia 公司的 Phastsystem 电泳仪)。染色液配方如下,0.1 g 联苯胺加入 5 mL 5% 冰醋酸,加热溶解后加入 5 mL 5% 氯化氨、5 mL 5% EDTA-Na、5 mL 0.3% 过氧化氢和 40 mL 蒸馏水。

过氧化物酶同工酶电泳胶片经染色后,由于各酶带酶活性不同,将着色深而清晰的酶带定为一级酶带,着色中等、清晰度略差的为二级酶带,着色很浅又不清晰的为三级酶带,不着色的为零级。

2 结果与分析

2.1 pI 6.1 酶带在抗、感白粉病的小麦品种品系中的表现规律

在对约 50 个品种品系进行了过氧化物酶同工酶 IEF 电泳分析之后,发现 pI 6.1 酶带在抗、感品种之间具有不同的表现规律。抗病品种品系的 pI 6.1 酶带从苗期(冬前 10 月份)、拔节期(4 月份)、扬花期(5 月份)至灌浆期(6 月份)均为一级酶带。感病品种却不同,冬前苗期多数品种的 pI 6.1 酶带为一、二级,拔节期至白粉病发生期酶带模糊不清甚至踪迹皆无,多为三级、零级酶带。直至感病之后酶活性才回升,再次表现为一、二级酶带(表 1)。由此可见,所有小麦品种均具有编码 pI 6.1 酶带的基因。苗期,它在抗病、感病品种中均可正常表达,而拔节期后,在感品种中可能受到某种抑制,造成产物减少甚至没有产物,因此利用这一时期 pI 6.1 酶带强度在抗病、感病品种之间的差别,将一级酶带视为抗病标记,二、三和零级酶带为感病标记作为生化指标,可在田间发病前鉴别小麦品种对白粉病的抗性。

2.2 pI 6.1 酶带在杂交后代中的表现

为了搞清 pI 6.1 酶带在感病品种出现酶活性下降的原因,对抗病品种 Yuma/Cc⁸、CI12632/Cc⁸和感病品种农大 015、京冬一号的 F₁、F₂ 以及 BC₁ 代(抗病品种/感病品种//感病品种)拔节期叶片过氧化物酶同工酶进行了分析。4 个 F₁ 的 pI 6.1 酶带均为一级(图 1)。119

表 1 抗病、感病品种 pI 6.1 酶带在不同生育期的表达级别

品种名称	冬 前	返 青 之 后					抗病性鉴定		
	10 月	4 月初	4 月中	4 月底	5 月	6 月	反应型	感病等级	抗性
Norman	1	1	1	1	1	1	0	0	高抗
CI12632/Cc ⁸	1	1	1	1	1	1	2	1	高抗
Armada	1	1	1	1	1	1	0	0	高抗
Yuma/Cc ⁸	1	1	1	1	1	1	3	1	高抗
Kahpli/Cc ⁸	1	1	1	1	1	1	2	3	抗
Maris Huntsman	1	1	1	1	1	—	0	0	高抗
Bert	1	1	1	1	—	1	1	1	高抗
小白冬麦	1	1	1	1	1	—	0	1	高抗
农林 73	1	1	1	1	1	1	0	0	高抗
红卷芒	1	1	1	1	—	1	0	0	高抗
无名大粒	1	1	1	1	—	—	3	3	中抗
B-17-5-8	1	1	1	1	—	1	1	2	高抗
中品-16-11-100	1	1	1	1	—	1	2	4	抗
京双 16	1	0	0	3	3	—	—	8	高感
京冬一号	1	3	3	0	0	—	4	6	高感
京冬六号	1	0	0	0	—	—	4	5	感
京冬八号	1	3	3	0	—	—	4	5	感
京花一号	1	0	0	3	2	—	4	5	感
京花五号	1	0	0	0	2	—	4	6	高感
京农 86-74	1	3	3	0	1	1	3	4	中感
北农二号	3	0	0	1	0	—	4	6	感
农大 015	3	0	3	0	—	—	4	6	感
农大 91	2	0	3	0	—	—	4	5	感
农大 92	2	3	2	3	—	—	4	6	感
农大 93	1	0	0	0	—	—	4	5	感
清农一号	1	3	3	3	—	1	—	6	高感
西安大穗	1	2	3	0	3	2	4	5	感
85-6301	1	0	0	3	—	1	4	5	感
91-086	1	2	3	2	—	2	4	6	高感
CA 837	1	3	3	0	0	2	4	5	感
CA 8695	1	3	0	0	1	2	4	5	感
临 7410	2	2	3	2	—	1	4	5	感
东 87	2	0	3	0	—	0	4	5	感
东 31	2	0	3	3	—	—	4	5	感
3043-1	1	0	3	3	—	0	4	5	感
山东 31130	2	3	3	3	0	2	2	5	中感
临远 84-50443	3	0	0	0	—	1	3	6	中感

株 F₂ 中 90 株的 pI 6.1 处为一级酶带, 29 株为二、三级酶带或没有此带, 基因正常表达植株和基因非正常表达植株之间的比值恰为 3 1。65 株 BC₁ 植株中 35 株为一级带, 另 30 株为二、三级酶带或没有此酶带。通过 χ^2 检测, $\chi^2 = 0.38 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, 比值符合 1 1 分离规律。正常表达与非正常表达的 pI 6.1 酶带在 F₂ 中以 3 1 的比率分离, 在 BC₁ 中以 1 1 的比率分离, 证明这一性状受一单基因控制。F₂ 中四分之一植株的 pI 6.1 酶带不能正常表达, 表明感病品种成株 pI 6.1 酶带活性下降是由一隐性基因所致。

3 讨论

过氧化物酶同工酶由核基因编码^[9~11], 基因互作或诱导物都会引起酶活性的变化。据本文中小麦品种苗期过氧化物酶同工酶 IEF 酶谱显示, 多数品种的 pI 6.1 酶带活性很强, 只有部分感病品种例外, 说明编码 pI 6.1 酶带的基因存在于所有小麦品种中。酶活性下降的现象发生在感病品种拔节期以后, 并符合孟德尔分离规律。由此证明, 在感染白粉病的小麦品种中, 一个与编码 pI 6.1 酶带基因连锁的隐性基因的表达, 是引起酶活性下降的原因。所以感病后 pI 6.1 酶带活性恢复可能有两种解释, 一为病原菌侵入可诱导编码 pI 6.1 酶带的基因正常表达, 或者认为病原菌侵入可抑制与编码 pI 6.1 酶带基因连锁的隐性基因的表达。

本研究比较了 20 个含不同 P_m 基因的品种, 其中含 P_m2、P_m4 和 P_m6 的品种对我国流行的白粉病小种表现高抗, 其他品种不同程度地感染白粉病。尽管如此, 20 个品种的 pI 6.1 酶带始终为一级。除此以外, 1995 年中国农业大学的李文胜等发现小麦品种“小白冬麦”和“复壮 30”各含有一个隐性 P_m 基因^[8], 这两个品种不同生育期的 pI 6.1 酶带与上述 20 个品种相同, 始终表现为一级。pI 6.1 酶带在抗病、感病品种中的不同表现, 说明它在小麦酶促防御系统中起着某种重要作用。

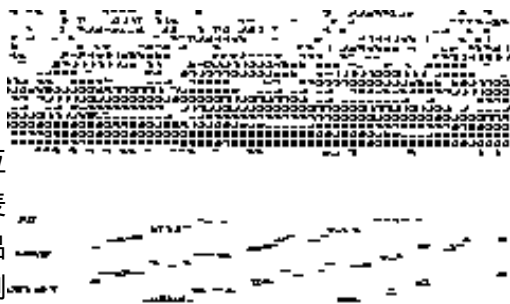


图 1 抗、感品种及其正、反交 F₁ 植株拔节期叶片过氧化物酶同工酶 IEF(pH5~8) 酶谱

1. 农大 015; 2. 农大 015//Yuma/Cc⁸;
3. Yuma/Cc⁸//农大 015; 4. Yuma/Cc⁸;
5. 京冬一号; 6. 京冬一号//CI12632/Cc⁸;
7. CI12632/Cc⁸//京冬一号; 8. CI12632/Cc⁸

参 考 文 献

- 1 盛宝钦. 小麦成株白粉病田间鉴定技术. 北京农业科学, 1992, 10(4): 16~17
- 2 张维强, 唐秀芝. 同工酶与植物遗传育种. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 81~83
- 3 李华琴. 小麦抗感白粉病生理生化特性的研究. 贵州农业科学, 1983(2): 40~45
- 4 胡广淦, 李清铎. 小麦抗感白粉病品种过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶的比较测定. 江苏农学院学报, 1989, 10(3): 27~32
- 5 沈其益等. 棉花感染枯萎病后过氧化物酶的变化. 植物学报, 1978, 20(2): 108~113
- 6 吴纯仁等. 玉米抗茎腐病与过氧化物酶活性的关系. 湖北农业科学, 1989(6): 14~16
- 7 朱睦元等. 大麦品种对黄叶病毒的抗性 with 过氧化物酶、酯酶的关系研究. 植物病理学报, 1989, 16(1): 43~47
- 8 李文胜等. 应用单体分析对三个小麦品种品系进行抗白粉病基因定位的研究. 中国农业大学学报, 1995 1(3): 39~45
- 9 Ainsworth C C, et al. The chromosomal locations of leaf peroxidase genes in hexaploid wheat, rye and barley. TAG, 1984, 69: 205~210

- 10 Angeles Bosch, *et al.* Leaf peroxidase-A biochemical marker for the group 2 chromosomes in the Triticinae. *Genet Res Camb*, 1986, 47: 103 ~ 107
- 11 Baga M, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of peroxidase gene from wheat. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29(24): 647 ~ 662
- 12 Stahman M A. Influence of host-parasite interactions on proteins, enzymes and resistance. *IBID*, 1967: 357 ~ 369
- 13 Steven Leath, Manfred Heun. Identification of powdery mildew resistant gene in cultivars of red winter wheat. *Plant Disease*, 1990, 74(10): 747 ~ 752

A Biochemical Marker for Resistance to Powdery Mildew in Wheat

Wang Lixin Su Qing Kang Tongtong Xu Minxin

(Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing Municipal Academy

of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100081)

Chen Zhe

(Crop Research Institute, Beijing Municipal Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing)

Abstract The isoelectric focusing gel electrophoretic approach was used in this study to compare the peroxidase isozyme bands of wheat varieties, which were either resistant or susceptible to powdery mildew. Great difference was found in the pI 6.1 band of peroxidase isozyme in leaves of resistant/susceptible varieties from the jointing stage to the occurrence of powdery mildew. The genes of the pI 6.1 band in the resistant varieties had a life-long normal expression. This band had a strong activity in the whole growing period of wheat and belonged to the first-class band category. When the expression was suppressed after the jointing stage of the susceptible varieties, resulting in ambiguity or even disappearance of the band, the band often belonged to the category of Class 3 or Class 0 bands. The enzyme gained activity after the infection of powdery mildew, resulting in the formation of Class 1 or Class 2 bands. In order to find the factors causing this difference, the peroxidase isozyme IEF bands in leaves were compared between the 119 F₂ plants of resistant/susceptible varieties and the 65 BC₁ plants of resistant/susceptible varieties. Results show that the decrease in the activity of the pI 6.1 band in susceptible adult plants is caused by another recessive gene.

Key words: Wheat; Peroxidase isozyme; Biochemical marker