

玉米小斑病菌C小种毒素对玉米雄性不育系及其保持系超氧化物歧化酶及过氧化物酶活性的诱导*

崔 洋 马春红 刘克明 魏建昆

(河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051)

摘 要 对玉米雄性不育系及保持系B73叶片超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定表明, 细胞溶质最高; 玉米雄性不育系B73-C、B73-T及其保持系B73-N叶片基态超氧化物歧化酶活性在细胞内的分布是: 细胞溶质最高(占总活性77%); 线粒体、叶绿体次之, 且SOD活性N细胞质显著大于C和T细胞质; 过氧化物酶(POX)的活性主要分布在线粒体和叶绿体中, 占总活性85%左右。用专化于C细胞质的C毒素(HMC毒素)处理B73C、T与N三种细胞质玉米叶片后, 这三种细胞溶质的SOD和POX酶活性均表现不敏感; 三种细胞质的线粒体有不同反应: B73-C的SOD活性下降, 导致细胞伤害, 而B73-T和B73-N的SOD活性稍有提高或持平, 保持了对C毒素的抗性。POX基本上随着SOD活性降低而增高或随着活性增高而降低。可见, HMC毒素能够诱导线粒体SOD和POX的活性, 而这两个酶活性与玉米抗病性密切相关。

关键词 玉米小斑病菌 雄性不育 超氧化物歧化酶 过氧化物酶

自1988年报道中国存在玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*) C小种后〔1〕, 进一步的研究〔7,8,9〕证实由C小种分泌的HMC毒素对C细胞质玉米具有强烈的专化性, 但关于造成这种专化性作用的机制和原因报道甚少。

60年代末, Fridovich等提出生物自由基伤害学说, 已被广泛地用于需氧生物细胞毒害机理的研究。SOD是一切需氧有机体中普遍存在的一种含金属的酶, 它能够清除造成膜脂过氧化作用的超氧化物阴离子自由基 O_2^- , 从而保护细胞膜结构。当植物处于逆境条件下, 细胞内自由基产生和清除的平衡就会遭到破坏, 如果有利于自由基的产生, 则积累的自由基就会对细胞造成伤害。关于植物SOD与大气污染(如 SO_2 、 O_3 等)、低温、干旱、盐分、强光等逆境胁迫的关系已有一些报道。但对植物感病后, 寄主SOD活性变化的研究目前还不多。水稻被枯萎病菌侵染后叶片的SOD变化非常小〔4〕, 但在蕃茄被烟草花叶病毒(TMV)感染30~40天后, 感病和抗病品种SOD活性均降低〔5〕; 在抗病和感病的菜豆上接种 *Uromyces Phaseoli*后, SOD活性均有提高, 但抗病品种提高的幅度较大〔6〕。因而寄主

感染病菌后 SOD 变化较为复杂,是否与抗病有直接关系,目前尚无定论。本文以同核异质玉米和对 C 细胞质专化性的小斑病菌 HMC 毒素为试材,研究在毒素侵染下,寄主 SOD 酶和 POX 酶活性变化规律,以探讨 SOD、POX 与抗病性的关系。

材料和方法

一、HMC 毒素的制备

将玉米小斑病菌 C 小种接种在 Fries 液体培养基中,恒温 25℃ 摇培 20 天,用三层滤纸滤去菌丝,在滤液中加入 3% (W/V) 的活性炭,放入 4℃ 冰箱过夜,用等体积的甲醇-氯仿洗脱活性炭,50℃ 减压蒸馏至干,然后加入小体积的热甲醇溶解,4℃ 冰箱过夜,收集结晶体,干燥备用。

二、样品处理与细胞器制备

选用由美国先锋种子公司提供的玉米雄花不育系及其保持系材料一套(B73-T、B73-C、B73-N),在五叶期时,取第二、第三叶片,沿中脉一分为二,一半浸入蒸馏水中作为对照,一半浸入浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的毒素液中处理,置于 25℃ 培养箱黑暗培养,分别在处理 0, 6, 12, 24, 48, 72 小时后取样,将处理好的叶片分别放入内加 2 ml 提取介质(0.3M 甘露醇、1mM EDTA、0.1% BSA、0.05M Tris, pH 7.4)冰浴的研钵内研磨,500g 离心 5 分钟去沉淀,上清液用 1000g 离心 10 分钟,沉淀为叶绿体;上清液再用 12800g 离心 15 分钟,沉淀为线粒体部分,上清液为细胞溶质部分,沉淀的叶绿体和线粒体分别悬浮在 1ml 0.05M Tris-HCl 缓冲液中 (pH 7.6),此液作为酶测定液。

三、蛋白含量测定

采用紫外分光光度计法测定。

四、SOD 酶活性测定

根据 Giannopolitis 和 Ries (1977) 方法,利用 SOD 抑制氮兰四唑 (NBT) 在荧光下的还原作用,3ml 反应混合液中含有 1.3 μM 核黄素,13 μM 甲硫氨酸,63 μM NBT,0.05M 磷酸缓冲液 (pH 7.8)。加入 20 μl 酶液后,在 4000 Lx 荧光下照射 15 分钟,在 560nm 下测定光吸收,以缓冲液代替酶液作为空白,酶活性单位采用抑制光化还原 NBT 50% 为一个酶活性单位。

五、过氧化物酶活性测定

参照“HRP”测定方法,3 ml 反应液中,pH 7.0 10mM 磷酸缓冲液 2.91ml,20mM 愈创木酚 0.05ml,酶液 0.02ml,40mM H_2O_2 0.02ml,34℃ 恒温下反应 3 分钟后,加入 20% TCA 0.2ml 中止反应,470nm 比色测定。酶活性 = 酶单位/蛋白含量 \times 反应酶液量 \times 时间。

试验结果

一、B73-C、B73-T、B73-N 叶片中不同细胞器 SOD 与 POX 活性分布

SOD 和 POX 活性分布见表 1, 表 2。SOD 广泛地分布在植物细胞的各个细胞器部分^[3]。玉米 B73 叶片细胞器内 SOD 活性在不同细胞器之间,差异显著。细胞溶质部份最高,占各

细胞器总活性的77.2%,叶绿体部分活性较低。在基态时B73-N细胞溶质和线粒体的SOD活性显著大于相应的B73-C和B73-T;而POX主要存在于叶绿体和线粒体中,各占细胞器总活性的42%,细胞溶质的POX活性较低。

表1 B73 (C、T、N) 叶片中SOD活性分布

细胞器	SOD活性(酶单位/mg蛋白·min)			各细胞器占总活性 平均百分率(%)
	B73-C	B73-T	B73-N	
叶绿体	0.65±0.43	1.69±0.82	0.73±0.82	11.2
线粒体	0.52±0.18	0.89±0.22	1.79±0.54	11.6
细胞溶质	7.30±0.10	5.26±0.27	8.43±0.09	77.2

表2 B73 (C、T、N) 叶片中POX活性分布

细胞器	POX活性(酶单位/mg蛋白·min)			各细胞器占总活性 平均百分率(%)
	B73-C	B73-T	B73-N	
叶绿体	161.06±3.50	141.57±7.90	134.79±6.57	42.2
线粒体	154.49±1.13	147.51±10.4	134.30±1.60	42.1
细胞溶质	53.59±7.28	53.76±0.55	55.74±14.75	15.7

二、HMC-毒素对同核异质系SOD和POX活性的诱导

1. HMC-毒素对B73线粒体SOD活性的诱导 B73的三种细胞质叶片在毒素处理12小时后,C细胞质叶片出现水渍状小点,而T和N细胞质无此现象,这是由于C毒素专门侵染C细胞质的结果。从图1可以看出,当C细胞质叶片外观尚未见到明显伤害症状时,其线粒体SOD活性已明显下降(6小时),而T与N细胞质分别在6与12小时SOD略有上升,说明毒素对B73同核异质系线粒体具有不同的诱导作用。

2. HMC-毒素对B73细胞溶质SOD活性的诱导 细胞溶质SOD活性见表3。

表3 不同处理时间同核异质细胞溶质SOD活性(酶单位/mg蛋白·min)

处理时间 (小时)	B73-C		B73-T		B73-N	
	健康	感病	健康	感病	健康	感病
6	3.99±0.30	3.77±0.21	3.21±0.54	3.77±0.75	3.45±0.87	3.11±0.71
12	2.55±0.84	3.29±0.51	3.31±0.20	4.18±0.85	4.28±0.39	3.74±1.80
24	3.37±0.22	3.21±0.62	4.06±0.77	3.93±0.13	3.50±0.76	3.48±0.37
48	4.46±0.46	4.06±0.50	3.24±0.30	3.38±0.23	3.72±0.86	3.52±0.06
72	1.25±0.82	3.11±1.13	1.67±0.53	3.58±0.71	0.81±0.73	3.20±1.49

由表3看出,B73-C、B73-T、B73-N各细胞溶质部分在用C毒素处理后,SOD活性几乎没有什么变化,即细胞溶质SOD活性对C毒素反应不敏感。

3. HMC毒素对B73线粒体POX活性的诱导 图2 a, B73-C线粒体POX活性较对照在48小时前均有不同程度的提高, 72小时略有下降; 图2 b和图2 c, 处理前期(12小时前)POX活性均有降低, B73-N24小时后, POX活性无显著变化, B73-T在48小时活性略有升高, 72小时后同对照活性无差异。简言之, 图2 三种细胞质的线粒体POX活性变化与其对应的图1 SOD变化方向相反, 即SOD降低, POX相应提高; 反之亦然。

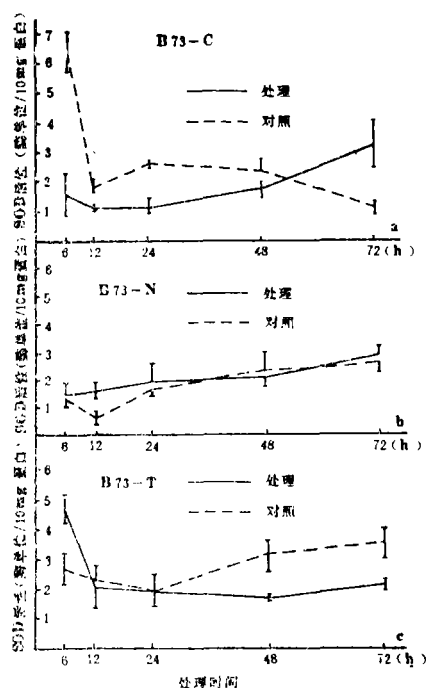


图1 HMC-毒素对B73各细胞质线粒体SOD活性的诱导

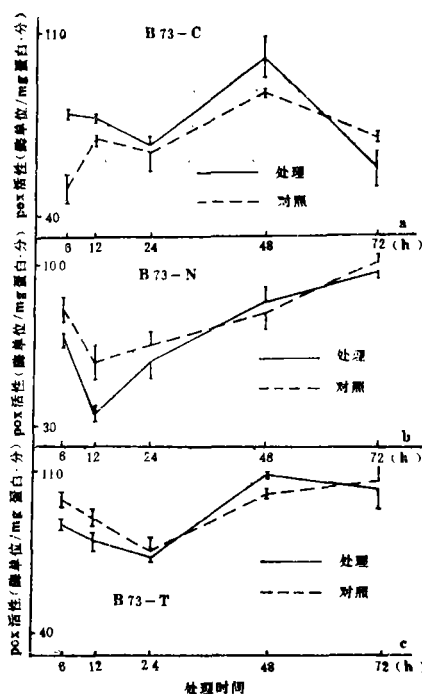


图2 HMC-毒素对B73各细胞质线粒体活性POX活性的诱导

4. HMC毒素对B73细胞溶质POX活性的诱导 从表4看出, (1) B73(三种细胞质)细胞溶质的对照POX活性随着离体时间的延长而升高。(2) 除72小时处理的B73-C的POX活性

表4 不同处理时间B73各细胞溶质POX活性

处理时间 (小时)	POX 活性 (酶单位 / mg 蛋白·min)					
	B73-C		B73-T		B73-N	
	健康	感病	健康	感病	健康	感病
6	14.05±1.52	16.51±1.63	14.72±2.93	11.00±1.36	13.29±3.58	14.96±4.98
12	17.86±1.35	15.74±0.80	18.44±0.84	17.68	12.47±0.62	13.77±1.47
24	18.96±1.72	16.55±2.95	15.85±1.43	16.31±1.62	13.44±1.34	13.39±0.90
43	25.68±1.01	22.63±2.59	21.4	20.43±1.72	20.79±1.89	24.85±2.69
72	28.11	32.35±1.4*	021.88±1.99	23.86±0.90	19.72±0.74	24.14±2.01*

较对照略有提高以外,三种细胞质不同时间的处理与对照之间无显著差异。也就是说,同核异质系细胞溶质的POX活性对HMC毒素不敏感。本结果与表3细胞溶质的SOD活性变化相一致。

讨 论

1970年,美国由于大面积种植德克萨斯雄性不育细胞质(TMS)导致玉米小斑病菌T小种大流行,损失严重。造成T细胞质遭受危害的主要原因在于T小种产生的寄主专化性毒素(HMT毒素)。关于HMT毒素的作用位点已有证据表明是在线粒体上。HMT毒素能阻碍T细胞质线粒体对苹果酸的氧化而促进还原态的辅酶—I(NADH)氧化;而用高于此浓度1000倍的T毒素处理正常细胞质线粒体仍无影响。另有报道,若HMT毒素短时期作用于线粒体,则毒素效应逆转。尽管线粒体对毒素的作用有证据表明只有一个作用位点,但最近对不同的生物进行检测比较,发现各种不同体系有严格的差别,因此不能排除其它作用位点也可能存在。

HMC毒素对B73三种细胞质线粒体内SOD和POX的诱导,表明其作用方式与HMT毒素相类似,均作用于细胞的线粒体中。在作用初期,HMC毒素促使B73-T, B73-N的SOD上升,这可能是“毒素效应逆转”的另一种表现。至于HMC毒素作用于线粒体的什么部位,还需进一步研究。

C毒素处理C细胞质之后,导致线粒体SOD活性下降,引起 O_2^- 水平提高,进而导致细胞伤害,而T和N细胞质的线粒体在一定时间范围内SOD活性稍有提高或持平,由于清除超氧阴离子的水平上升,从而保持对C毒素的抗性。

在叶片基态时,B73-N的SOD活性最高,B73-C其次,B73-T最低,这与已报道的玉米细胞质质量特性相一致,即抗逆能力 $N>S>C>T$ (2),本实验从分子水平进一步证实了这个结论。SOD与POX活性与玉米抗病性密切相关。

鸣谢 本试验得到张敬贤、李俊明同志大力协助,河北农大刘玉艳同学参加部分试验,深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Jian-Kun Wei et al. Pathological and physiological identification of race C of *binaria maydis*, in China Phytopathology, 1988, 78 (5) : 550~554
- 2 Jian-Kun Wei et al. Protoplasmic parameters of Zea mays with normal and male sterile cytoplasm. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1989, (35) : 543~553
- 3 Kono Y et al. Superoxide dismutases from kidney bean leaves. Plant Cell Physiol, 1979, (20) : 1229~1235
- 4 XIATSUYAMA N. Time-course alteration of lipid peroxidation and the activities of superoxide dismutase, Catalase and peroxidase in blast-infected rice leaves. Annual of the Phytopathological Society of Japan, 1983, (49) : 270~273
- 5 MATKOVICS B. et al. Enzymatic and metabolic changes of tomato plants after TMV

- infection *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 1978, (172) : 315~318
- 6 Buonauro R et al. Soluble Superoxide Dismutase in susceptible and resistant host-Parasite complexes of *phaseolus vulgaris* and *uromyces phaseoli*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1987, (31) : 173~184
- 7 刘克明等. 玉米小斑病菌三个生理小种生物学特性比较的初步研究. *华北农学报*, 1989, 4 (2) : 74~87
- 8 郭兰凯等. HMC毒素对雄花不育及正常细胞质玉米根冠活细胞的影响. *作物学报*, 1991, 17(1) : 54~57
- 9 崔洋等. 玉米小斑病菌C小种毒素的分离纯化及其植物病理反应. *植物病理学报*, 1991, 21(3) : 187~191

Effect of *Bipolaris* (*Helminthosporium*) *Maydis* Race C (HMC) Toxin on Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities of Corn with Male Sterile or Normal Cytoplasm

Cui Yang Ma Chunhong Liu Keming Wei Jiankun

(*Institute of Agro-physics, Plant Physiology and Biochemistry, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang*)

Abstract The localization of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX) activities in leaf cells of corn with male sterile cytoplasm (B73-C B73-T) and normal cytoplasm (B73-N) was determined. The results showed that SOD activity was the highest in cell solute (about 77% of the total) and lower in mitochondria and chloroplast. SOD activity of cell solute and mitochondria in N cytoplasm was significantly higher than that in C and T cytoplasm. As to POX, about 85% of its total activity was present in the mitochondria and chloroplast, and 15% was in the cell solute. When the leaves of all the three cytoplasm (B73-C, T and N) were treated with the host-specific toxin produced by *B. maydis* race C, their SOD and POX activities in the cell solutes were not affected. There existed a negative correlation between SOD and POX activities in mitochondria of B73-C, B73-T and B73-N. Therefore, the activities of SOD and POX in mitochondria could be induced by HMC-toxin and the activity of both enzymes was related to disease resistance of corn.

Key words: *Bipolaris* (*Helminthosporium*) *maydis*; Male sterile cytoplasm; Superoxide dismutase; Peroxidase