

稻瘟病菌致病毒素对水稻雄性不育细胞质 POD、SOD 和酯酶同工酶的影响*

闫芝芬¹ 陈永芹² 崔四平¹ 马春红¹ 魏建昆¹

(1 河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051; 2 河北邯郸农业专科学校)

摘 要 以水稻核基因型为协青早的 4 种同核异质雄性不育细胞质(D 协青早 A, G 协青早 A, T 协青早 A, W 协青早 A)及其保持系正常细胞质(协青早 B)的一叶一心期幼苗为试材,通过对野败性雄性不育细胞质具有专化侵染性的稻瘟病菌 90-2 菌株产生的粗毒素浸根处理 4 h 后,用等电聚焦电泳法测定叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酯酶同工酶谱的变化,比较分析了各同核异质不同细胞质对处理反应的病理生理差异。结果显示,同核情况下不同细胞质试材的 SOD、POD 和酯酶同工酶谱存在不同程度的差异,毒素处理后其同工酶谱的反应也存在不同程度的区别,细胞质的不同除引起 SOD、POD 等的酶活性存在差异外,对 SOD、POD 和酯酶同工酶谱也有一定的影响,表明 POD 同工酶谱的变化与抗性有一定关系。

关键词 水稻 细胞质雄性不育 毒素 稻瘟病 酯酶同工酶 过氧化物酶同工酶 超氧化物歧化酶同工酶

中图分类号 S435.111.49 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7091(1999)增刊 0101-06

水稻稻瘟病是导致水稻减产的主要病害之一。本课题组多年的研究^[1~3]已表明,水稻雄性不育细胞质(CMS)在同核情况下,不同 CMS 的细胞质质量参数(物理、生理生化等)存在差异,可作为细胞质质量的评估指标,其质量优劣与对稻瘟病的抗性有一定关系;并从自然界中分离鉴定出了水稻野败型 CMS 专化性侵染小种稻瘟病菌 90-2 菌株,对其产生的致病毒素的致病性、稳定性及影响活性的条件也已作了一些研究。还从活性氧伤害的角度及抗性相关酶方面测定了野败型 CMS 及其保持系对该毒素的反应差异,也揭示了呼吸作用的强弱及参与氧化作用的酶 POD、SOD 等活性大小的变化^[1]与野败型 CMS 专化感病性之间的关系,从生理病理水平上揭示了稻瘟病菌 90-2 菌株对野败型 CMS 专化致病的机制。本研究采用等电聚焦电泳法(IEF)探讨稻瘟病菌 90-2 菌株产生的致病毒素对水稻同核异质不同 CMS 试材叶片中与抗性有关的 POD 同工酶、SOD 同工酶以及酯酶同工酶酶谱的影响,旨在进一步了解水稻不同 CMS 的抗病性生理代谢的反应差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1999-06-04 收稿。

* 河北省自然科学基金资助项目。

作者简介:闫芝芬,女,1963 年生,副研究员,理学硕士,主要从事微生物学及植物病生理研究工作。

核基因型为协青早的 4 种水稻雄性不育细胞质(CMS)(D 协青早 A, G 协青早 A, T 协青早 A, W 协青早 A)及其正常细胞质即保持系(B)(协青早 B)。试材由湖南杂交稻研究中心罗崇善先生提供。

1.2 材料的处理

试材在苗期(一叶一心期)用稻瘟病菌 90-2 菌株产生的致病毒素的粗提物(粗毒素)浸根处理^[3],处理后 4 h 取第 1、第 2 片真叶进行同工酶的制备和分析。对照仍为自来水培养。

1.3 酶液的制备

各样品分别精确称取叶片 0.2 g,剪成小段后,在液氮中研磨成粉状,分别加入 2 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl, pH8 提取;之后,在 4℃、8000 r/min 离心 30 min,上清液即为酶液。

1.4 等电聚焦电泳

酯酶同工酶、过氧化物酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶的测定采用等电聚焦电泳法。用 pH 3.5~9.5 的两性电解质,按 LKB 等电聚焦说明书制作含 Ampholine(pH3.5~9.3)的聚丙烯酰胺凝胶,胶厚度 0.5 mm,采用平移法制胶。在 LKB 电泳仪上(10W, 10℃)进行高压电泳,预电泳 15~30 min,加样后电泳 2~3 h,每种样品加样量为 20 μ L。

1.5 凝胶的染色

1.5.1 过氧化物酶(POD)的染色 参照文献[4]进行。0.5 mol/L 醋酸缓冲液, pH7.0, 50 mL;联苯胺 50 mg(用少量无水乙醇预溶);3%的双氧水, 10 滴。

用上述溶液浸没凝胶片,在室温下立即显天蓝色谱带,30 min 后变为褐色谱带,用自来水冲洗后,显橘红色谱带。7%的冰醋酸固定保存。电泳胶板照相并在岛津双波长扫描仪上波长 470 nm 处进行扫描。

1.5.2 超氧化物歧化酶(SOD)的染色 参照文献[4]进行。A 液:50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5, 100 mL;MTT, 200 mg。B 液:50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5, 100 mL;TEMED(四甲基乙二胺)0.4 mL;核黄素 1 mg。用 A 液浸没凝胶片,黑暗 30℃ 20min,倒去 A 液。将凝胶片转入 B 液,照光(日光灯)15 min,并不断摇动染色盘,使其均匀染色,直至显无色(白色)谱带,终止反应。在 7%醋酸溶液中固定,观察记录。

1.5.3 酯酶的染色 参照文献[4],略有修改。乙酸- α -萘酯-坚牢蓝 RR 盐法。即乙酸- α -萘酯 100 mg 溶于少量丙酮;坚牢蓝 RR 盐 200 mg;再溶于 100 mL 0.1 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液中。

将凝胶片浸入上述溶液中,酶带显深棕色,用水漂洗后在乙醇凝胶洗涤液中固定。电泳胶板照相并在岛津双波长扫描仪上进行扫描,波长 470 nm。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对以协青早为核背景的 4 种 CMS 及正常细胞质试材的致病力

表 1 稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对协青早同核异质 CMS 的致病力

水稻品种	根冠细胞死亡率(%)
D 协清早 A	22.09
G 协清早 A	16.14
T 协清早 A	13.69
W 协清早 A	26.87
协清早 B	9.25

注:对照为蒸馏水处理,根冠细胞死亡率为 3%~5%

采用根冠细胞死亡率法测定稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对以水稻协青早为核背景的 4 种 CMS 及正常细胞质的致病性(表 1),稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素的制备参见文献[2]。从表 1 可见在同核情况下,由于细胞质存在的差异造成了不同材料对稻瘟病菌毒素敏感性的差异,正常细胞质抗病性最强,野败型的 CMS 对稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素最敏感,根冠细胞死亡率最高,与正常细胞质相比差异明显。也进一步说明稻瘟病菌 90-2 菌株对野败型 CMS 具有较强的致病力。

2.2 稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对以协青早为核背景的 4 种 CMS 及正常细胞质苗期(一心一叶期)酯酶同工酶谱的影响

在用毒素处理以水稻协青早为核背景的 4 种 CMS 及正常细胞质幼苗前后的酯酶同工酶谱带中,处理前 5 种试材的酯酶同工酶带数都是 7 条,且它们的电泳位置相同,只是有的同工酶条带有深浅即酶活性大小的区别,表明细胞质之间酯酶同工酶活性存在着差异;处理后的样品与未处理的对照样品相比,D 协青早 A 与对照比所有同工酶带变浅,活性下降,第 6 条带消失;G 协青早 A、T 协青早 A 与其对照相比,酶谱的条带数、深浅以及条带的位置基本上无变化,但 T 协青早 A 的酯酶同工酶活性高于 G 协青早 A;W 协青早 A 与对照相比,酯酶同工酶条带数没变,但第 4、5 条带变浅,活性有所降低;正常细胞质协青早 B 与对照相比,活性有所降低,第 5 条带变浅,第 6、7 条带消失。实验结果显示了在以协青早为核背景的同核情况下,由于 CMS 的不同引起了酯酶同工酶对稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素处理的反应出现差异(图 1)。由此推测,酯酶同工酶对毒素处理的变化与试材对毒素敏感性的差异关系不大。

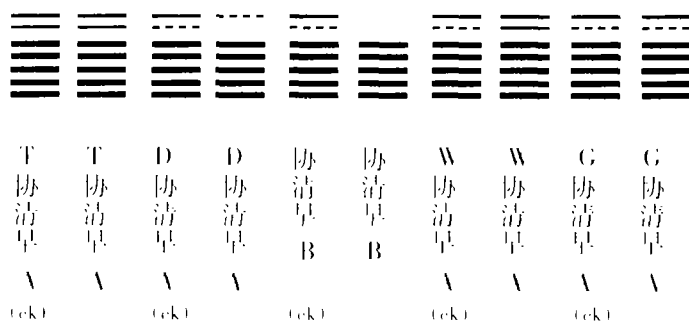


图 1 毒素处理对水稻协青早同核异质 CMS 及其正常细胞质酯酶同工酶的影响

2.3 稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对以协青早为核背景的水稻 4 种 CMS 及正常细胞质苗期(一心一叶期)POD 同工酶谱的影响

前文[3]已报道 SOD、POD 等酶活性与稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对野败型珍汕 97A 的特异侵染性有关,本研究进一步分析该毒素对 SOD、POD 代谢途径的影响。从图 2 可以看出,未经处理的不同细胞质材料之间 POD 同工酶谱存在一些较小的差异,包括条带的深浅、次要条带的有无等差异。经毒素处理 4 h 后,不同试材的 POD 同工酶谱有不同程度的变化,其中 D 协青早 A 与未处理的对照相比,POD 总活性提高,第 4、5、8、9、13 条带颜色变深,出现第 15、16 小带;G 协青早 A 与未处理的对照比较,POD 总活性也提高了,条带数目变化不大,但第 3、4、5、6、8、9、10、12、13、15、16 条带颜色变深;而 T 协青早 A 与未处理的对照相比,基本上无变化;W 协青早 A 与未处理的对照相比,POD 总活性提高,条带数目无变化,第 2、5、12 条带颜色

变深,第 9 条带略变浅;协青早 B 与未处理的对照比较,POD 总活性提高不大,POD 同工酶谱的条带数无变化,只是第 5 条带略微变深。可知,D、G、W 协青早 A 的 POD 同工酶对毒素处理比较敏感,变化大,一些 POD 同工酶条带活性有一定提高;只有 W 协青早 A 的第 9 条带略变浅,这一条带可能与对毒素的特异敏感性有关;而 T 协青早 A 和协清早 B 的 POD 同工酶对毒素处理敏感性较低,变化较小,说明二者对毒素耐受性较强,这与表 1 的结果是一致的。

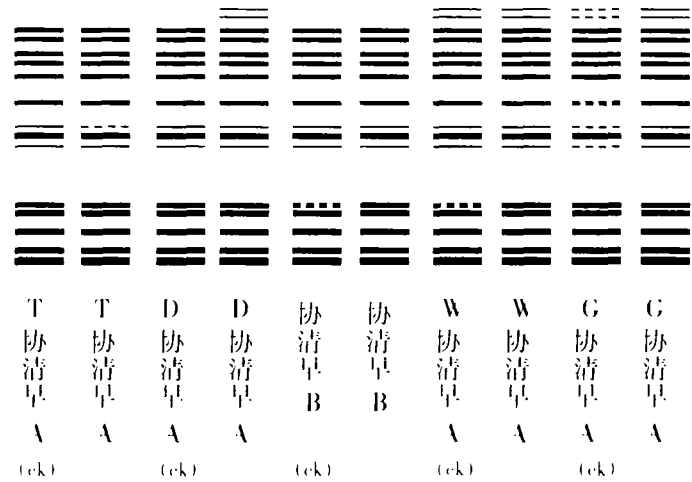


图 2 毒素处理对水稻协青早同核异质 CMS 及其正常细胞质 POD 同工酶的影响

结果还表明,毒素处理后,引起协青早不同 CMS 的 POD 同工酶活性或代谢途径发生变化,不同细胞质变化大小程度不同,体现了细胞质病理生理反应上存在的差异,并说明 POD 同工酶谱的变化与协青早不同 CMS 的抗病性大小有一定关系。

2.4 稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素对以水稻协青早为核背景的 4 种 CMS 及其正常细胞质苗期(一叶一心期)SOD 同工酶谱的影响

图 3 显示了毒素处理 4 h 后的以水稻协青早为核背景的 4 种 CMS 及其正常细胞质苗期

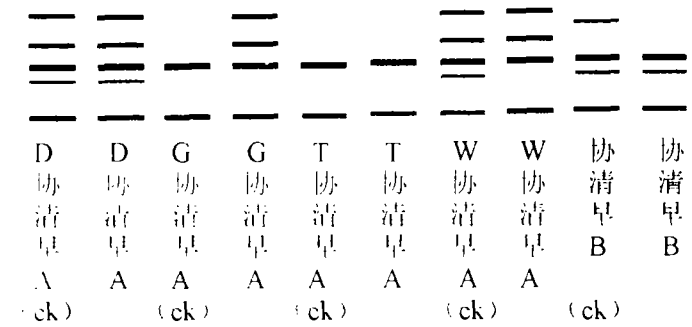


图 3 毒素处理对水稻协青早同核异质 CMS 及其正常细胞质 SOD 同工酶的影响

的 SOD 同工酶谱的变化情况,D 协青早 A 和 T 协青早 A 分别与其未处理的对照相比,SOD 总活性、条带数和深浅变化不大;G 协青早 A 比未处理的对照多出第 4、5 条带,SOD 总活性有所提高;W 协青早 A 比未处理的对照,活性微微降低,第 2 条带消失;协青早 B 比未处理的对照,SOD 活性也略有降低,第 4 条带消失。实验结果表明,不同细胞质之间 SOD 同工酶谱差异明

显,它们对毒素的反应也迥然不同。但经用该毒素处理 4 h 后测定的试验结果尚不能表明 SOD 同工酶谱与不同试材对毒素敏感性大小的关系。

3 讨论

许多报道^[3,5,6]指出,SOD、POD 活性与植物的抗病性有关,酯酶活性与品种有关。前文也已说明水稻不同 CMS 材料受毒素侵害后所引起的活性氧伤害,内源活性氧清除系统(内源保护酶活力大小)的功能能否仍维持相对较高的水平,反映了细胞质之间抗病性的优劣。研究进一步表明水稻 CMS 间抗病性差异的生理生化基础,揭示了 CMS 间这些同工酶代谢途径上的差异。

幼苗期用稻瘟病菌 90-2 菌株粗毒素处理以协青早为核背景的 4 种同核异质 CMS 及其正常细胞质试材,结果表明,4 种 CMS SOD 同工酶条带差异较大,经毒素处理后,它们的反应也不相同;4 种 CMS 及其正常细胞质的酯酶同工酶谱基本无差异,只是活性稍有不同,对毒素的反应强度也略有不同;而 POD 同工酶谱的变化情况表明,经毒素处理后,所有试材 POD 酶活性提高,但是活性的提高及提高的程度,不同品种间存在差异。试验结果表明,POD 酶活性变化与品种对毒素的敏感性成反比。

同核异质的各 CMS 间存在的同工酶谱的差异,起因于细胞质遗传背景的不同。各 CMS 与正常细胞质之间,因细胞质 DNA 发生变异而引起细胞质不育,同时也引起一些酶活性或酶代谢途径发生一定变化,这可能导致不同细胞质对毒素的不同反应。然而,不同 CMS 细胞质间的这些生理生化的差异与 CMS 在基因水平上是平等的关系,还是 CMS 的伴随结果,尚需进一步研究,以查明毒素处理前后 CMS 线粒体 DNA 的结构或表达的变化情况,稻瘟病菌 90-2 菌株产生的对野败型 CMS 的专化性致病毒素的作用机制。

参 考 文 献

- 1 闫芝芬,马春红,魏建昆等.水稻雄性不育细胞质质量及其与稻瘟病抗性的关系.华北农学报,1996,11(增刊):69~74
- 2 闫芝芬,张红心,崔四平等.稻瘟病菌致病毒素的活性及其影响条件.见:植物病原菌毒素研究进展(第一卷).北京:中国科学出版社,1997.239~244
- 3 闫芝芬,马春红,魏建昆.水稻雄性不育细胞质对稻瘟病菌致病毒素的专化性致病机制.中国农业科学,1998,31(6):56~61
- 4 张维强,唐秀芝.同工酶与植物遗传育种.北京农业大学出版社,1993,167~190
- 5 张晓葵,王保仁,邓江明.水稻品种对稻细菌性条斑病菌的抗性与过氧化物酶、多酚氧化酶及酯酶同工酶的关系,湖南农业科学,1994,4:39~40
- 6 徐朗莱,叶茂炳,徐雍皋等.过氧化物酶及其同工酶与小麦抗赤霉病性的关系.植物病理学报,1991,21(4):285~290

Effect of Toxins from *P. oryzae* 90-2 on POD, SOD and Esterase isozymes of Rice Male-Sterile Cytoplasm

Yan Zhifen¹ Chen Yongqin² Cui Siping¹ Ma Chunhong¹ Wei Jiankun¹

(1 Agro-physics, Plant Physiology and Biochemistry Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051; 2 Handan Agricultural College of Hebei, Handan)

Abstract The seedlings of four kinds of rice Xieqingzao CMS and their normal cytoplasm with homocaryon, used as experimental materials, were treated soakedly by crude toxins from *P. oryzae* 90-2 strain which was special pathogenic to wild abortive rice CMS. After four hours of treatment, IEF was utilized to detect their changed states of SOD, POD and esterase isozymes in their leaves in order to analysis the differences of pathologic reaction among them. The results showed that differences of these isozyme types in homocaryon CMS existed to some extent. The experiments revealed that their reactions of activities and isozyme types to the toxins were different. The experiment can obtain the conclusion that the change of POD isozyme types is related to resistance of CMS to the toxins in rice.

Key words: *Pyricularia oryzae*; toxin; Rice; Male-sterile cytoplasm; Peroxidase; Superoxidase dismutase; Esterase; Isozyme