

抗锈小麦新品系与感病品种甘麦8号的水杨酸含量和相关酶类活性的变化*

邢更妹 李 杉 崔凯荣 王根轩*

(兰州大学干旱农业生态国家重点实验室, 甘肃兰州 730070)

摘 要 抗锈小麦新品系89144接种锈菌后 SA 含量升高, 同时 CAT 活性降低, H₂O₂含量升高, SOD 活性升高, 在不抗锈品种甘麦8号接种锈菌后 SA 含量也有升高, 但并不伴随有 CAT 活性下降和 SOD 活性升高以及 H₂O₂含量的升高。推测 SA 为 CAT 过氧化活性提供一个电子的过程中 SA 的量必须达到一定的阈值, 并且与 CAT 的时序调节相配合。据 SA 结合态和游离态含量的变化动态, 推测 SA 信号传导途径的上游应该还有一些机制在起作用, 同时89144具有 SA 信号传导途径。

关键词 水杨酸; 过氧化氢酶; 过氧化氢; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶

中图分类号: S512 **文献标识码**: A

Change in SA Content and Relative Enzymes Activities in Two Wheat Varieties Differing in Rust-resistance after the Inoculation of *Puccinia striiformis f. sp. tritici*

XING Gengmei LI Shan CUI KaiRong WANG Gen-Xuan

(The State Key Laboratory of Arid Agroecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Changes in SA content and relative enzymes activities were investigated after the inoculation of *Puccinia striiformis f. sp. tritici* in leaves of two spring wheat (*Triticum aestivum*) varieties that differ in rust-resistance: 89144 (rust-resistant) and Gannai 8 (rust-sensitive). In 89144, the increase in SA content was accompanied with the decrease in CAT activity and increase in H₂O₂ content and SOD activity. While in Gannai 8, the increase in SA content was not accompanied with the above changes observed in 89144. It was deduced that only when the content SA reached a certain level, could it give e⁻ to CAT and coordinate with the regulation of CAT. According to the dynamic changes of the content of free and combine SA, it was concluded that other regulation mechanism might be existed in the upstream of the signaling transduction pathway and SA signaling transduction pathway might be employed in 89144.

Key words SA; CAT; H₂O₂; SOD; POD

小麦条锈病是小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) 引起的在我国小麦生产区危害最严重的小麦病害之一, 防治方法主要以培养抗病品种为主, 然而由于条锈菌的毒性进化导致抗病品种的抗性迅速丧失, 以致造成小麦条锈病周期性爆发, 为了进一步控制小麦条锈病, 对于抗病机理, 以及条

锈菌克服寄主抗病性的机制的研究是十分必要的。水杨酸 (salicylic acid SA) 是近年来研究证明与植物抗病反应有重要关系的信号分子, 它可以激活某种与植物抗病相关的防御机制, 涉及并参与植物的过敏性反应 (Hypersensitive response, HR) 和系统获得性抗性 (Systemic acquired resistance, SAR) 反应,

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金资助(25001-A 21-032-N), 国家重大基础研究发展规划项目(G1999011705), 中科院沙坡头站开放基金资助项目(200018)。

作者简介: 邢更妹, 女(1963-), 副教授。 * 通讯联系人。

Received on(收稿日期): 2000-12-26, Accepted on(接受日期): 2001-04-12

在植物 SAR 信号传导和 HR 反应中起着关键作用^[1,2]。此外,发现植物体中的 SA 受体具有过氧化氢酶(catalase, CAT)活性,而 SA 抑制其活性,提高植物叶片内源 H₂O₂水平,而 H₂O₂或它的衍生物活性氧,进一步激活抗病反应途径中与抗病相关基因的表达^[3,4]。并有报道 SA 处理植物叶片可提高植物中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)的活性,这些酶都与 H₂O₂代谢有关^[5]。为此,我们通过花粉管通道法将高粱 DNA 导入丰产而对锈病亲合的小麦品种甘麦8号的后代中并对大量变异系进行筛选,选育出对锈病不亲合的小麦新品系89144,并进行了抗病性鉴定、生物学特性和胚乳蛋白的研究和光合特性^[6,7],蛋白质双向电泳^[8]以及 RAPD 的分子验证^[9]等,不仅证明该新品系抗锈性强,且稳定,同时表明属转基因新品系。本研究正是在原有的工作基础上探讨89144的抗锈机理。

1 材料和方法

1.1 小麦新品系89144与其受体品种甘麦8号进行回交选择

用89144作非轮回亲本,甘麦8号作轮回亲本在一定的条锈菌侵染压力场下进行回交,选择表现型除抗锈性状外其它性状与甘麦8号相似的单株,穗行种植回交。进行株行种植,自交2代选择抗锈性状不分离的株行进行如下实验。

1.2 水杨酸含量的测定

小麦种子浸种后,播种于装有蛭石的塑料钵内,在一叶展叶期利用涂抹法接种小麦条锈菌混合菌种,接种后培养在13~19℃,光照12 h/d,湿度保持100%,接种后24小时、32小时、40小时、48小时、56小时取材。参照李兆亮的方法^[10],用硅胶板纯化粗提液,然后用 HPLC 检测样品中(SA)含量, HPLC 仪器型号为 WatersTM 600E C-18柱,检测温度为40℃,流速为0.6 mL/min,检测波长为310 nm,保留时间4.05分钟。

1.3 蛋白质含量的测定

用考马斯亮蓝按 Bradford^[11]法进行测定。

1.4 CAT 活性的测定

0.5 g 叶片加1.8 mL 预冷的提取缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.25 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 10.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PM SF)研磨或匀浆后在4℃条件下27000 g 离心15

分钟,上清液按崔凯荣的^[12]方法测定酶活。

1.5 H₂O₂含量的测定

参考 Patterson 等^[13]的方法,1 g 叶片加3 mL 冷丙酮磨成匀浆,16000 g 离心10 min,上清液定容,反应液中含0.1 mL 20% (v/v) TiCl₄的浓盐酸,0.2 mL 浓氨水和1 mL 上清液。生成的过氧化物-Ti 复合物用丙酮洗5次,丙酮挥发后溶于3 mL 硫酸(1 mol/L)中,测410 nm 光吸收值,按同样程序制 H₂O₂标准曲线。

1.6 SOD 活性的测定

0.5 g 叶片加1.8 mL 预冷的提取缓冲液(50 mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液,0.1 mmol/L EDTA, 0.3% (w/v) TritonX-100; 4% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP polyvinylpyrrolidone)研磨后以纱布过滤,并以10500 g 离心20 min,上清液为粗酶液。SOD 活性按照 El Moshaty^[14]的方法,根据 SOD 抑制 NBT 光化学还原的量计算酶活性。

1.7 POD 活性的测定

参考崔凯荣^[12]的方法,取0.5 g 叶片加1.8 mL 预冷的提取缓冲液(100 mmol/L PBS, pH6.0, 内含0.1% (v/v) Triton X-100和0.04% (w/v) 的偏重亚硫酸钠。冰浴研磨,14000 g 离心15 min。以愈创木酚作底物,在470 nm 处测 OD 值,以 OD/min mg 蛋白为酶活单位。

2 结果

2.1 SA 含量变化

在接种锈菌后,通过 HPLC 测定结合态与游离态 SA 含量变化结果如图1、2。89144游离态水杨酸从32小时开始逐渐升高,40小时达到峰值,然后开始缓慢下降到48小时急剧下降,甘麦8号从

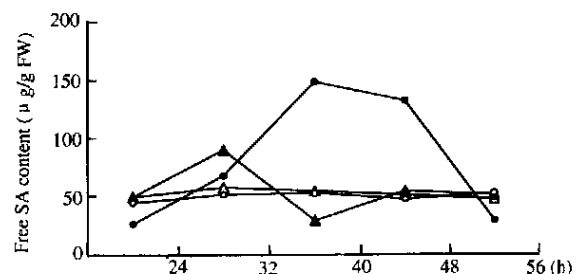


图1 游离态水杨酸含量的变化

Fig 1 Changes on free SA content

甘麦8号 un inoculated 89144 un inoculated
甘麦8号 inoculated 89144 inoculated

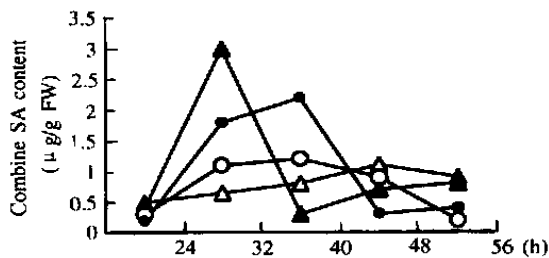


图2 结合态水杨酸含量变化

Fig 2 Changes on combine SA content
甘麦8号 uninoculated 89144 uninoculated
甘麦8号 inoculated 89144 inoculated

24小时开始缓慢上升, 上升幅度比89144小2倍, 而在未接种锈菌的对照中89144和甘麦8号的内源游离SA 含量变化都不大。

图2表明, 在接种后89144、甘麦8号的结合态SA 含量都有上升, 并且甘麦8号比89144上升幅度大而时间早, 在对照中, 89144、甘麦8号的结合态SA 含量变化不大。

2.2 CAT 活性变化

由图3可以看出, 89144 CAT 活性在接种条锈菌40小时开始大幅度下降, 48小时后又略有回升, 而甘麦8号变化不大, 在未接种条锈菌的89144、甘麦8号CAT 活性变化不大。

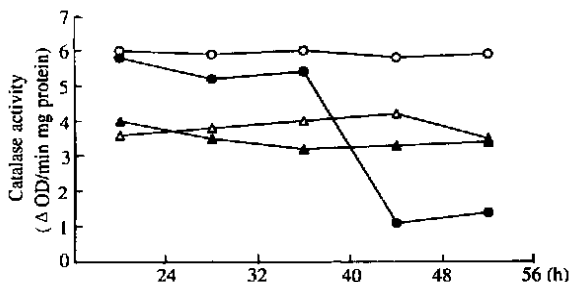


图3 CAT 活性变化

Fig 3 Changes on CAT activity
甘麦8号 uninoculated 89144 uninoculated
甘麦8号 inoculated 89144 inoculated

2.3 H₂O₂含量变化

图4表明在接种锈菌48小时后, 在89144中H₂O₂含量达到峰值, 甘麦8号的H₂O₂含量也略有升高, 而对照89144、甘麦8号H₂O₂含量变化不大。

2.4 SOD 活性变化

图5表明, 在接种菌种后40小时89144的SOD活性开始增高, 到48小时达到峰值, 尔后迅

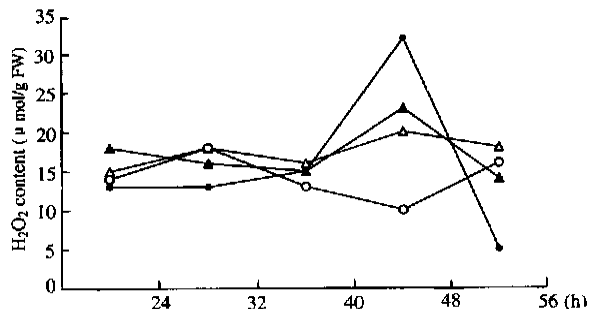


图4 过氧化氢含量的变化

Fig 4 Changes on H₂O₂ content
甘麦8号 uninoculated 89144 uninoculated
甘麦8号 inoculated 89144 inoculated

速下降。而甘麦8号从32小时开始缓慢增高, 但增高幅度不大。而在对照中89144和甘麦8号的SOD 活性变化都不明显。

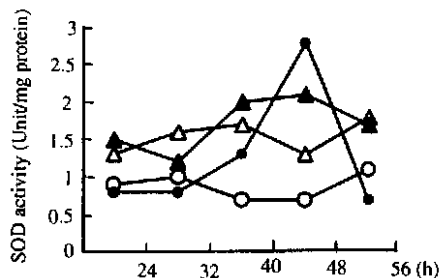


图5 SOD 活性变化

Fig 5 Changes on SOD activity
甘麦8号 uninoculated 89144 uninoculated
甘麦8号 inoculated 89144 inoculated

2.5 POD 活性变化

图6中的POD 酶活变化无论在接种条件下还是在未接种条件下, 变化都不大, 只是在接种56小时后89144的POD 活性稍有升高。

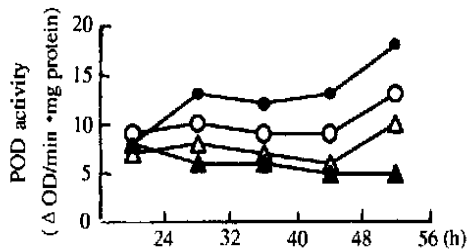


图6 POD 活性变化

Fig 6 Changes on POD activity
甘麦8号 uninoculated 89144 uninoculated
甘麦8号 inoculated 89144 inoculated

3 讨论

89144接种锈菌40小时后内源游离 SA 含量达到峰值,但从40小时至48小时有一个缓慢下降阶段,同时伴随着CAT活性降低, H₂O₂含量的增加, SOD活性的增高,这些与烟草中的变化相一致^[15]。Chen等^[3,4,15]已证明在烟草中的SA结合蛋白(SA-binding protein, SABP)具有CAT活性,它可降解H₂O₂产生O₂和H₂O。SA阻遏SABP的CAT活性,SA为CAT的过氧化活性提供一个电子而作为电子供体,同时抑制这些酶,使其处于不活跃状态^[16],从而导致H₂O₂含量升高。在不抗锈品种甘麦8号接种锈菌后也有内源游离SA含量升高,但并不伴随有CAT活性下降和SOD、POD活性的升高,也没有H₂O₂含量的上升。从本实验结果可以看出虽然89144和甘麦8号接种锈菌后,SA含量都有升高,只是甘麦8号H₂O₂含量达到峰值的时间早,峰值低,因此我们推测SA为CAT过氧化活性提供一个电子的过程中SA的量必须达到一定的阈值,并且与CAT的时序调节相配合。在我们的实验中还发现,甘麦8号,89144接种锈菌后游离SA含量增高,结合态SA含量也升高,所以游离SA在锈导条件下的含量升高不一定来自于结合态SA的释放,而有可能是在植物体内与SA合成相关的基因被启动。如果情况的确如此的话,在SA信号传导途径的上游应该还有一些机制在起作用,89144接种锈菌后SOD活性也有升高,SOD可使O₂⁻,通过歧化反应产生H₂O₂,在正常条件下,植物体内的SOD活性足以清除体内的O₂⁻,使O₂⁻保持在正常生理水平。但在逆境条件下,O₂⁻水平的提高刺激了SOD活性的增加,这可能与病原物诱导的氧化喷发有关。多数报道认为植物细胞壁中的POD可能与植物氧化喷发有关^[17]。但在我们的实验中并没有发现POD活性的大幅度变化,也许在检测时POD活性已恢复常态,这也符合氧化喷发的时相。由此推测在植物体内H₂O₂含量升高可以通过多种途径造成,Chen等的实验也证明H₂O₂或它的衍生物活性氧可激活抗病反应途径中相关基因表达。

References

- [1] Lin Z-P (林忠平), Hu Y-L (胡莺雷). Stress resistance of plants induced via the salicylic acid-mediated signal transduction pathway. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1997, 39: 185~188
- [2] Klessing D F, Malamy J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol*, 1994, 439~458
- [3] Chen Z, Klessing D F. Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in the signal transduction in the plant disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8179~8183
- [4] Chen Z, Saliva H, Klessing D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 262: 1883~1886
- [5] Yuan Yongbing (原永兵), Liu Chenglian (刘成连), Ju Zhiguo (鞠志国), et al. Regulation of salicylic acid to the hydrogen peroxide content and its mechanisms in apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 1997, 24(3): 220~224
- [6] Wang Yafu (王亚馥), Chen Keming (陈克明), Zhou Wenlin (周文麟), et al. Studies on biological characters and endosperm protein of variation lines obtained by introducing exogenous DNA into wheat. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1995, 21(4): 404~411
- [7] Zhou Wenlin (周文麟), Ni Jianfu (倪建福). Studies on DNA transfer from C4 crop to wheat. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1992, 18(6): 418~424
- [8] Wang Xiaojuan (王晓娟), Kong Yingzhen (孔应珍), Wang Yafu (王亚馥). Studies on the photosynthetic characteristics of wheat variants by introduction sorghum DNA. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica* (实验生物学报), 2000, 33(2): 195~198
- [9] Wang Xiaojuan (王晓娟), Li Xinglin (李兴林), Ni Jianfu (倪建福), et al. Changes of the Mixograph curve of the Progenies of wheat with introduced sorghum bicolor DNA. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2000, 33(1): 53~56
- [10] Li Zhaoliang (李兆亮), Yuan Yongbing (原永兵), Li Dongmei (李冬梅). Determination of salicylate in plant leaves by combination with TLC and HPLC. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1997, 33(2): 130~132
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantity of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- [12] Cui Kairong, Xing Gengsheng, Liu Xinmin et al. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science*, 1999, 146: 9~16
- [13] Patterson B D, Mackae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem*, 1984, 139: 487~492
- [14] El-Moshaty F I, Pike S M, Novacky A J, Shegal O P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997, 43: 109~119
- [15] Chen Z, Ricigliano J W, Klessing D F. Purification and characterization of soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9533~9537
- [16] Durner J, Klessing D F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalase. *J Biol Chem*, 1996, 271: 28492~28501
- [17] Auh C K, Murphy T M. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by Phytophthora elicitor-stimulated rose cells. *Plant Science*, 1999