

唐 成,陈 露,安敏敏,等. 稻瘟病诱导水稻幼苗叶片氧化还原系统的特征谱变化[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):141-144.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.047

稻瘟病诱导水稻幼苗叶片氧化还原系统的特征谱变化

唐 成¹, 陈 露^{2,3}, 安敏敏², 马爱梅², 杨立明², 罗玉明²

(1. 江苏省淮安市高新技术创新中心, 江苏淮安 223301; 2. 淮阴师范学院生命科学学院/

江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300; 3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

摘要:为了探究水稻幼苗叶片受稻瘟病菌侵染后氧化还原状态的影响,以水稻感病种质日本晴、抗病种质武运梗 7 号为材料,接种本区域稻瘟病菌混合小种,测定水稻叶片内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等活性氧清除酶系的活性,以及丙二醛(MDA)含量、可溶性蛋白含量。结果表明,稻瘟病菌侵染后水稻抗病材料、感病材料幼苗叶片内 SOD、POD、CAT 等活性氧清除酶系活性均增强,且 MDA 含量、可溶性蛋白含量都呈增加趋势。感病材料日本晴活性氧清除酶系活性的增加幅度明显大于抗病材料。

关键词:水稻;稻瘟病;活性氧清除酶系;氧化还原平衡

中图分类号:S435.111.4⁺1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2014)12-0141-03

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,是全球约 40% 人口的主食。水稻产量直接影响我国的粮食安全及农业可持续发展。在影响水稻产量的生物胁迫因子中,稻瘟病是造成水稻减产的主要因素之一。稻瘟病在水稻生长发育的各个阶段以及各个部位都有发生,主要有苗瘟、叶瘟、穗瘟、节瘟、谷粒瘟等类型,其中比较常见且对水稻危害最严重的是叶瘟、穗瘟^[1-2]。稻瘟病是由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起的一种真菌性病害,主要特征是病斑具有明显的褐色边缘,中央灰白色,遇到潮湿环境时,病部呈灰色霉状物^[3-4]。稻瘟病分布广泛,在全球多个国家、地区都有流行。近几年来,我国长江中游、西南、东北等稻作区经常发生大面积稻瘟病病害,水稻减产严重^[5]。在病害流行的年份,一般减产 10%~20%,较严重可达 40%~50%,大发生时甚至颗粒无收^[6-7]。稻瘟病因其分布范围广、造成危害大而受到广泛重视^[8]。植物抗病的生理生化反应是通过酶催化活动来实现的。正常情况下,植物体内产生的活性氧系统有利于保护植物体,同时也作为第二信使进行信号传递,这时活性氧清除酶系、抗氧化系统处于较低水平的动态平衡。一旦植物体受到病害胁迫,会导致植物体内活性氧积累,打破二者的平衡状态,从而导致活性氧类物质积累,打破植株体内氧化还原系统的平衡,引发植物体的抗病反应。活性氧清除系统包括抗氧化酶类,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等,抗氧化物质有谷胱甘肽(GSH)、

抗坏血酸(ASA)、维生素 E 等^[9]。潘汝谦等研究表明,黄瓜感染霜霉病后体内 POD 活性迅速升高,且 SOD 酶活性也明显上升^[10]。魏颖颖等研究表明,烟草与黄瓜花叶病毒互作中过氧化氢酶(CAT)活性显著上升^[11]。本研究以水稻感病材料日本晴、抗病材料武运梗 7 号为材料,接种江苏省淮安市本地的稻瘟病菌混合生理小种后,测定水稻叶片内 SOD、POD、CAT 等活性氧清除酶系的活性变化以及丙二醛(MDA)含量、可溶性蛋白含量的变化,探讨不同遗传背景的水稻种质资源与稻瘟病的抗性关系,旨在为防治稻瘟病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选用的水稻品种为感病材料日本晴、抗病材料武运梗 7 号,所接种的稻瘟病菌菌株为淮安市本地的稻瘟病菌生理小种。挑选颗粒饱满、大小一致的种子,洗净后用水浸泡,在 26~28℃ 保温箱中保温催芽,挑出露白一致的种子播于纱网上,将催芽 4~6 d 的幼苗(即当苗长至 1 叶 1 心期时)用海绵松地包裹,嵌入打孔泡沫板(厚度 1.5 cm)中,移至盛有 2 L 1/2 Hoagland 营养液塑料箱,在 HP1000GS 型智能人工气候箱中培养。昼夜温度分别为 28、26℃,空气相对湿度为 70%~80%。幼苗适应生长 1 d 后进行喷雾接种处理。

1.2 喷雾接种处理

将上述稻种的水稻幼苗分为日本晴健康株对照、日本晴接菌处理株、武运梗 7 号健康株对照以及武运梗 7 号接菌处理株。健康株对照的处理方法是在水稻幼苗叶片上均匀喷雾接种缓冲液,接菌处理株则是在叶片上喷雾接种含淮安市本地稻瘟病菌混合小种的悬浮液,接种后 0、1、2、3、4、5、6 d 天各取样 1 次,测定水稻幼苗叶片中 POD、SOD、CAT 等保护酶系活性的变化及 MDA 含量、可溶性蛋白含量变化,每个样品设置 4 个重复。

1.3 生理指标的测定

1.3.1 SOD 活性测定 称取 0.5 g 水稻叶片放入研钵中,加 5 mL 预冷的磷酸缓冲液研磨成匀浆,10 000 r/min 离心

收稿日期:2014-02-18

基金项目:江苏省高校优秀科技创新团队[编号:苏教科[2013]10 号];江苏省淮安市科技支撑计划(农业)(编号:SN130127);江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题(编号:HZHL1002)。

作者简介:唐 成(1982—),男,江苏沐阳人,硕士,农艺师,从事水稻品质与分子机理研究。E-mail:yanglim10@163.com。

通信作者:罗玉明,教授,研究方向为作物保护。Tel:(0517) 83525128;E-mail:yumingluo@163.com。

20 min, 低温保存上清液, 其上清液即为酶的粗提取液, 采用 NBT 还原法测定 SOD 活性^[12-13]。

1.3.2 POD 活性测定 取 1 mL 上述酶的粗提取液, 以愈创木酚为底物, 测定 470 nm 处的吸光度, 酶活性用每克蛋白每分钟 $D_{470\text{ nm}}$ 增加值表示。

1.3.3 CAT 活性测定 采用魏颖颖等的方法, 将 1.5 mL 浓度为 30% 的 H_2O_2 用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值为 7.0) 稀释定容至 125 mL, 取反应液 2.8 mL, 加入上述酶的粗提取液 0.2 mL, 以反应液为对照, 测定 CAT 活性^[13]。

1.3.4 MDA 含量测定 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[14] 测定叶片的 MDA 含量。

1.3.5 可溶性蛋白含量测定 称取 0.5 g 水稻叶片放入研钵中, 加 5 mL 蒸馏水研磨成匀浆, 10 000 r/min 离心 20 min, 后取上清液 1 mL 用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量, 以牛血清蛋白作为标准。

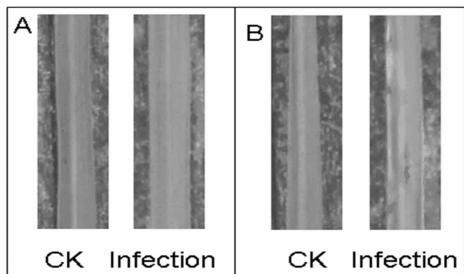
1.4 数据处理

用 SPSS 16.0 软件统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 接种稻瘟病菌对水稻幼苗形态的影响

从水稻叶片喷雾接种稻瘟病菌混合小种 10 d 后发病的表型来看, 其稻瘟病发病表型已有明显显现。感病材料日本晴接种菌处理株的幼苗叶片上边缘及中央产生了椭圆形或梭形病斑, 中间灰白色, 外围为褐色, 最外层有黄色晕圈, 呈现严重的发病表型。抗病材料武运梗 7 号的幼苗叶片没有明显的病斑 (图 1)。由此可见, 不同遗传背景的水稻种质受稻瘟病菌侵染后抗性表现不同。



A 为武运梗 7 号幼苗叶片; B 为日本晴幼苗叶片; CK 为接种缓冲液的叶片; Infection 为稻瘟病菌侵染的叶片

图 1 水稻叶片喷雾接种稻瘟病菌混合小种 10 d 的发病表型

2.2 接种稻瘟病菌对水稻幼苗叶片活性氧清除酶系活性的影响

2.2.1 接种稻瘟病菌的水稻幼苗叶片中 SOD 活性变化

SOD 是植株体内清除超氧阴离子的酶系, 负责把过量的超氧阴离子转化为过氧化氢。喷雾接种本地稻瘟病菌混合小种后, 水稻幼苗叶片内 SOD 的活性随处理时间的延长而提高 (图 2)。日本晴幼苗叶片的 SOD 活性提高幅度较大, 武运梗 7 号叶片的 SOD 活性在接种后 1~5 d 内呈上升趋势, 接种后 6 d 稍有下降。稻瘟病菌侵染后可能引发了日本晴叶片内超氧阴离子含量增加, 植株需要增加 SOD 活性以快速清除过量的超氧阴离子。

2.2.2 接种稻瘟病菌的水稻幼苗叶片中 POD 活性变化

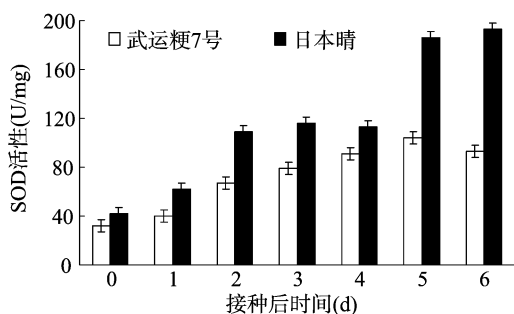


图 2 喷雾接种稻瘟病菌混合小种后水稻幼苗叶片中 SOD 活性变化

稻幼苗叶片接种稻瘟病菌之后, 叶片内 POD 的活性均显著 (图 3)。其中日本晴叶片接种后 6 d POD 活性比对照提高约 6 倍; 武运梗 7 号植株叶片内 POD 活性变化相对平缓, 提高幅度较小。POD 是植物细胞用来清除过氧化氢、酚类、胺类等毒害物质的抗氧化酶, 该酶活性的提高暗示稻瘟病导致了叶片内上述毒害物质的积累, 从而引发了 POD 活性的增强, 以分解毒害物质。

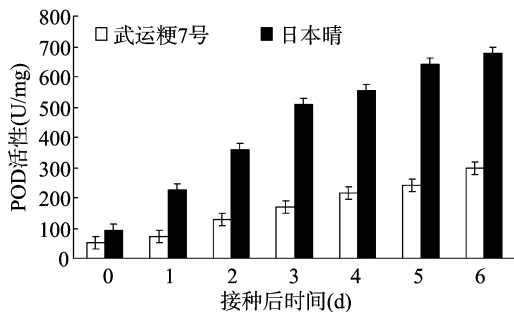


图 3 喷雾接种稻瘟病菌混合小种后水稻幼苗叶片中 POD 活性变化

2.2.3 接种稻瘟病菌的水稻幼苗叶片中 CAT 活性变化 接种稻瘟病菌混合小种后, 日本晴叶片中 CAT 活性随处理时间的延长呈上升趋势, 抗病材料武运梗 7 号叶片的 CAT 活性随处理时间的延长呈先上升后下降趋势 (图 4)。CAT 活性在稻瘟病病情较重的叶片内活性较高, 表明稻瘟病致使叶片的氧化还原平衡被打破, CAT 活性增强以缓解植物受到的伤害。

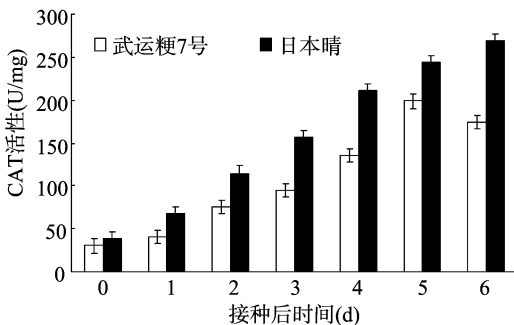


图 4 喷雾接种稻瘟病菌混合小种后水稻幼苗叶片中 CAT 活性变化

2.2.4 接种稻瘟病菌的水稻幼苗叶片中 MDA 含量变化 水稻幼苗叶片未受到稻瘟病菌侵染时, 抗病材料与感病材料叶片中 MDA 含量差别较小, 随着侵染时间的延长, 抗病材料与感病材料叶片中 MDA 含量都呈上升趋势, 且武运梗 7 号叶片内 MDA 含量的增加幅度小于日本晴叶片 (图 5)。MDA 含量

增加表明植株叶片在感染稻瘟病过程中发生了膜脂过氧化,日本晴叶片内 MDA 含量增高表明其受稻瘟病伤害的程度重于武运梗 7 号。

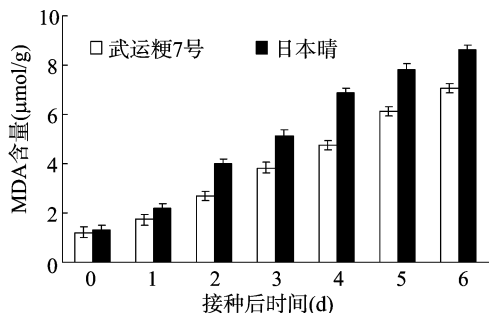


图5 喷雾接种稻瘟病菌混合小种后水稻幼苗叶片中MDA含量变化

2.2.5 接种稻瘟病菌的水稻幼苗叶片中的可溶性蛋白质含量变化 稻瘟病菌侵染水稻后,水稻叶片细胞中的可溶性蛋白质含量出现了明显变化。感病材料日本晴、抗病材料武运梗 7 号叶片中可溶性蛋白质含量都呈上升趋势,且感病材料叶片内可溶性蛋白含量增长幅度大于抗病材料(图 6)。

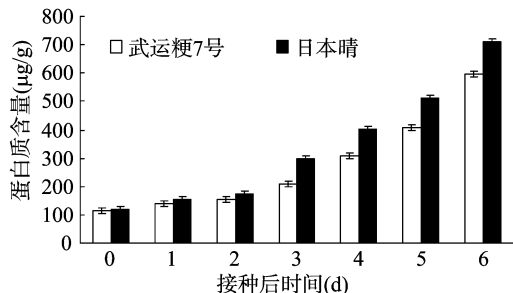


图6 喷雾接种稻瘟病菌混合小种后水稻幼苗叶片中可溶性蛋白质含量变化

3 结论与讨论

本试验中,稻瘟病菌侵染水稻抗病材料、感病材料幼苗叶片后,叶片内 SOD、POD、CAT 等活性氧清除酶系活性均增强,且 MDA 含量、可溶性蛋白含量都呈增加趋势。感病材料日本晴活性氧清除酶系活性的提高幅度明显大于抗病材料,这可能是由于稻瘟病菌侵染的刺激,打破了植株体内氧化还原系统的平衡,引起叶片内活性氧含量增加,为了减缓活性氧对植物细胞的破坏,活性氧清除系统的酶类 SOD、POD、CAT 活性提高以清除活性氧,同时,由于活性氧的积累致使膜脂过氧化,故而膜脂氧化的最终产物 MDA 含量增加。在病原物的刺激下,可能会抑制水稻体内蛋白降解酶的活性或激活蛋白合成酶的活性,从而导致水稻叶片细胞内可溶性蛋白质含量增加。抗病能力较强的水稻种质因具有较强的免疫力,对病害抗性较强,受到稻瘟病菌侵染后,体内活性氧的积累量较感病种质相对较低,需要调动的活性氧清除酶系统的增加幅度相对较小。本研究也表明氧化还原系统在水稻抗稻瘟病过程中发挥着重要作用。在病害环境下,细胞内氧化还原平衡体系的维持对植物的抗病性非常重要,SOD、POD、CAT 等是植物体内清除活性氧物质的重要酶,它们的活性高低可作为植物抗逆性的指标。SOD 是植物体内防御活性氧毒性的重要酶,它能清除超氧化物阴离子自由基,提高植物抗逆性。

POD 不仅能聚成本质素防御入侵病原菌,而且和 CAT 一样属于植物体内重要的活性氧清除酶类,其作用是将 H_2O_2 降解成为无毒害的 H_2O 、 O_2 [15]。MDA 是膜脂氧化的最终产物,它直接影响膜上结合酶的比例、活性,过量的 MDA 会对细胞产生毒害作用。可溶性蛋白质不仅是基因表达的直接产物之一,同时也是植物性状表现的物质基础。研究表明,甜瓜植株受蔓枯病菌侵染后,抗病材料的 SOD、CAT 活性均高于感病材料,且抗病材料的 POD 活性提高幅度明显小于感病材料 [16]。陈昱等在研究稻瘟病菌粗毒素的致病力及其对水稻幼苗生理生化特性的影响时发现,粗毒素处理后,随着处理时间的延长,POD 活性提高,SOD 活性表现为初期上升,一段时间后又下降的趋势 [17]。郭连安等研究表明,不同稻瘟病菌粗毒素浓度处理后,水稻幼苗的 POD 活性先升高后降低,可溶性蛋白含量显著下降 [18]。陈学平等研究表明,经烟草普通花叶病毒处理后,抗病烟草品种 CAT 活性低于感病品种 [19]。本研究表明,接种本地稻瘟病菌混合小种后,水稻抗病材料、感病材料叶片内的活性氧清除酶系活性、可溶性蛋白质含量基本都呈增加趋势,并且感病品种的增加幅度明显高于抗病品种,可能是日本晴作为稻瘟病情较重的受体,其免疫能力较弱,受致病菌株侵染后,破坏了叶片内氧化还原系统的平衡,活性氧类物质含量增加,对细胞造成了伤害,而其自身免疫系统保护机制的应答调节了活性氧清除酶系,抗氧化物质的活性增强,以减缓其受伤害程度。根据活性氧清除系统的酶系所催化的反应过程,并结合植物体细胞内活性氧的代谢过程,本研究提出了水稻受稻瘟病菌侵染后氧化还原系统状态变化及活性氧代谢路径图,以期更好地理解水稻对稻瘟病的应答机制(图 7)。

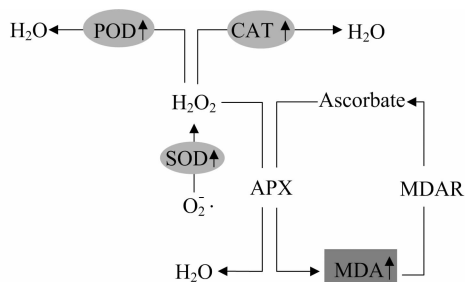


图7 稻瘟病诱导水稻幼苗叶片活性氧清除系统的反应途径

参考文献:

- [1] Miah G, Rafii M Y, Ismail M R, et al. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(3): 2369 - 2388.
- [2] Liu W D, Liu J L, Ning Y S, et al. Recent progress in understanding PAMP - and effector - triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Molecular Plant, 2013, 6(3): 605 - 620.
- [3] Bagnaresi P, Biselli C, Orrù L, et al. Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51609.
- [4] Rahim H A, Bhuiyan M A, Lim L S, et al. Identification of quantitative trait loci for blast resistance in BC₂F₃ and BC₂F₅ advanced back-cross families of rice [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(3): 3277 - 3289.

夏彦飞,郑伟,苏盼盼,等. 枯草芽孢杆菌 OKB105 菌株不同培养基发酵上清液的杀线活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):144-147.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.048

枯草芽孢杆菌 OKB105 菌株不同培养基 发酵上清液的杀线活性

夏彦飞¹, 郑伟¹, 苏盼盼¹, 乔俊卿², 王建华³, 黄晓博¹

(1. 河南科技大学,河南洛阳 471003; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014;

3. 江苏省宜兴市金丰农产品有限责任公司,江苏宜兴 214200)

摘要:采用室内离体测定方法,测试枯草芽孢杆菌 OKB105 菌株在不同培养基(Landy、LB、λ 肉汤、TY、超级肉汤、胰化蛋白胨肉汤、TYGPN、A、M63、M9)的发酵滤液中对植物寄生线虫[南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*) 2 龄幼虫、程氏伞滑刃线虫(*Bursaphelenchus chengi*)、豆伞滑刃线虫(*B. doui*)、拟松材线虫(*B. mucronatus*)]的生物活性,以期获得具有较高防效的发酵培养基。结果表明:OKB105 菌株的培养滤液分别处理植物寄生线虫 6 h 后,对南方根结线虫 2 龄幼虫防效较佳的发酵培养基是 TYGPN、LB、LANDY、TY、胰化蛋白胨肉汤、超级肉汤等 6 个培养基;对豆伞滑刃线虫防效较佳的是 TYGPN 和 TY 等 2 个培养基;对豆伞滑刃线虫、拟松材线虫防效最佳的是 TYGPN 培养基;OKB105 菌株 TYGPN 培养基发酵上清液对 4 种标靶线虫都具有较强的拮抗性。

关键词:枯草芽孢杆菌;植物寄生线虫;培养基;发酵滤液;杀线活性;拮抗性

中图分类号: S432.4⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0144-04

植物寄生线虫分布广,寄主多,是危害农作物的主要病原生物之一,每年给主要农作物造成的损失高达 1 250 亿美元,同时它能使真菌和细菌易侵染植物,也是诱发植物病害的重要原因之一^[1]。化学防治植物寄生线虫具有防效好、见效快

的特点,但是不可避免地污染了自然环境,因此生物防治越来越受到广泛的关注^[2]。利用细菌生防植物寄生线虫是当今新的研究热点,各种各样的细菌从寄主植物、线虫体、线虫的卵、土壤中被分离,其不同的作用方式已被报道^[3-7]。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)能够产生耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂的内生孢子,是理想的生防菌筛选对象^[8]。关于芽孢杆菌防治线虫的研究,国内外已有大量的报道^[9-15]。本研究通过室内离体试验对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) OKB105 菌株在不同培养基上的发酵上清液对 4 种植物寄生线虫[南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)、豆伞滑刃线虫(*B. doui*)、程氏伞滑刃线虫(*B. chengi*)]的防效进行评估。

收稿日期:2014-03-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201558);河南科技大学博士启动基金(编号:09001590);河南科技大学试验技术开发基金(编号:SY1213023);河南科技大学 SRTF 项目(编号:2013257)。

作者简介:夏彦飞(1980—),男,安徽砀山人,博士研究生,讲师,从事植物寄生线虫的生物防治研究。Tel:(0379)64282345;E-mail:xyfwcc@163.com。

[5]刘占领,雷财林,程治军,等. 水稻稻瘟病抗性基因定位与克隆研究进展[J]. 作物杂志,2007(3):16-19.

[6]胡景涛,黄文章,严明建. 分子标记辅助选择在稻瘟病抗性育种中的应用[J]. 安徽农业科学,2010,38(16):8347-8349.

[7]Roy-Bannan S, Bharat B C. Rice blast fungus sequenced[J]. Current Science,2005,89(6):930-931.

[8]温小红,谢明杰,姜健,等. 水稻稻瘟病防治方法研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(3):190-195.

[9]Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,1998,49(1):249-279.

[10]潘汝谦,黄旭明,古希听. 活性氧清除酶类在黄瓜感染霜霉病过程中的活性变化[J]. 植物病理学报,1999,29(3):287-288.

[11]魏颖颖,王凤龙,钱玉梅,等. 烟草与黄瓜花叶病毒互作中过氧化氢酶活性的变化[J]. 烟草科技,2005(10):36-39.

[12]李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:167-168.

[13]张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2003:268-269.

[14]汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999:305-306.

[15]Vieira Dos Santos C, Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response[J]. Trends in Plant Science,2006,11(7):329-334.

[16]周晓慧, Wolukau J N, 李英,等. 甜瓜蔓枯病抗性与 SOD、CAT 和 POD 活性变化的关系[J]. 中国瓜菜,2007(2):4-6.

[17]陈昱,钟鸣,侯玉柱,等. 稻瘟病菌粗毒素的致病力测定及其对水稻幼苗生理生化的影响[J]. 种子,2006,25(5):20-23.

[18]郭连安,张玲,胡运高,等. 稻瘟病菌粗毒素对水稻幼苗生理生化的影响[J]. 贵州农业科学,2011,39(10):105-107.

[19]陈学平,姚忠达,郭家明,等. 不同烟草品种感染 TMV 病程过程中 CAT、PAL 活力变化研究[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(2):103-107.