

水稻对白叶枯病菌抗性与活性氧关系的研究^{*}

廖朝晖, 朱必凤, 刘安玲

(韶关学院英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要: 以 3 种水稻白叶枯病菌和 4 个抗、感水稻品种为样品, 研究了水稻对白叶枯病菌抗性与白叶枯病菌细胞保护酶以及氧自由基的关系。研究表明: 接种 15 d 的水稻 SOD、POD 显示活性, 而 CAT 无活性; 用水稻叶片酶解液培养 3 种病原菌, 菌体显示 SOD 和 CAT 活性, 但未测出 POD 活性。抗、感水稻对白叶枯病菌的影响不同, 感病水稻使病原菌 SOD 和 CAT 活性升高, 抗病水稻使白叶枯病菌 SOD、CAT 活性降低。而抗、感水稻对白叶枯病菌氧自由基的影响, 正好与对酶的影响相反。

关键词: 水稻; 白叶枯病菌; 氧自由基; 细胞保护酶

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 04-0078-04

水稻白叶枯病, 即稻黄单孢杆菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *Dryzae*), 是严重影响水稻生产的三大病害之一, 早已引起世界各水稻生产国的重视。生物技术在水稻—白叶枯病菌研究体系中的应用为阐明白叶枯病菌的致病机制和水稻的抗病机制提供了新的思路和方法。我国分子植物病理学家在水稻对白叶枯病抗性的研究中已做了大量的工作^[1-5], 取得了一些令人鼓舞的进展, 然而对水稻抗感机制的了解仍很有限。例如, 氧自由基与植物感病和抗病密切相关, 但是, 植物抗病过程中活性氧的升高, 是寄主受病原菌诱导升高的, 还是病原菌与寄主共同作用的结果? 以往的研究主要集中在抗、感水稻对白叶枯病菌侵染所作出的反应, 而水稻对病原菌的细胞保护酶及氧自由基的影响则少见报道。为此, 本文研究了水稻叶细胞酶解液对白叶枯病菌氧自由基及其细胞保护酶的影响, 为了解水稻对白叶枯病菌抗性与活性氧的关系, 也为进一步阐明水稻—白叶枯病菌互作的分子机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

白叶枯病菌 PX061、PX086 (中国农科院作物所提供), JX01 (由南昌大学朱友林先生提供)。培养基为 NB 液体培养基, 26 °C, 120 r/min 摇瓶培养 36 h, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体。重新悬浮于 0.1 mol/L Tris HCl 缓冲液 (pH 7.8) 中, 使菌

体密度达到每 mL 1×10^9 个, 其中相当于培养液总体积的一半留作接种, 另一半用 20 KHz (5 min) 的超声波破碎细胞, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清保存备用。

1.2 水稻

感病水稻为沈农 1033, 抗病品种为近等基因系 CBB7、CBB4 (中国农科院作物所提供) 以及 8077 (湖北省农科院张集文先生提供)。

1.3 接种与取样

采用剪叶法接种 (菌种密度为每 mL 10^9 个), 以 0.1 mol/L Tris HCl 缓冲液 (pH 7.8) 接种为对照。接种后 15 d 取病斑约 1 cm 处叶片作为样品。

1.4 叶片酶液提取

按上述方法取叶片, 加入 ($m:V=1:5$) 冷提取液 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.8, 并含 6 mmol/L 抗坏血酸, 6 mmol/L 半胱氨酸, 6 mmol/L EDTA 及 $w=5\%$ PVP), 冰浴上研磨, 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 取上清作 SOD、POD 和 CAT 酶活测定。

1.5 水稻提取液与白叶枯病菌的处理

取水稻五叶幼苗地上部分, 加液氮研磨, 再加 0.1 mol/L Tris HCl 缓冲液 (pH 6.8), 研磨, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液置 -45 °C 保存。沉淀加入纤维素酶 ($w=3\%$)、果胶酶 ($w=1\%$), 28 °C 摇床 (120 r/min) 反应 6 h, -45 °C 保存。

将水稻白叶枯病菌菌液加入到水稻提取液 (50 mL) 中, 使菌密度达到每 mL 1×10^9 个, 以同样体

* 收稿日期: 2002-04-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001446)

作者简介: 廖朝晖 (1968—), 女, 讲师, E-mail: ZHLIAO68@yahoo.com.cn

积 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8) 作对照, 26 ℃ 振荡培养 9 h, 分别在 1, 3, 6, 9 h 取样, 沉淀用超声波破碎, 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8) 稀释至上清液相同体积, 测活性氧及 SOD、CAT、POD 活性。

1.6 超氧阴离子 (O₂⁻) 测定

参照 Zacheo 和 Bleve Zacheo 的方法^[9], 以 1 mL 待测液中 SOD 抑制的 580 nm 消光系数变化 0.1 为 1 个浓度单位。

1.7 H₂O₂ 的测定

参照蒋明义和郭绍川的方法进行^[7], 415 nm 比色, H₂O₂ 浓度以 mmol/L 表示。

1.8 酶活性测定

SOD 活性按 Fridovich 和王爱国的方法测定^[8,9], 以抑制氮蓝四唑 (NBT) 光化还原 50% 作为一个活性单位 (U)。CAT 活性测定采用波饮诺克的方法进行^[10], 以每分钟消耗 1 μmol/L H₂O₂ 作为一个活性单位 (U)。POD 活性测定按 Jasclawala 等^[11] 的愈创木酚法测定, 以每 min A 值增加 0.01 作为一个活性单位 (U)。

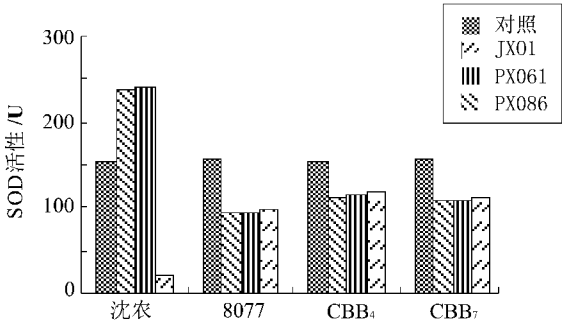


图 1 接种 15 d 水稻中 SOD 活性变化

Fig 1 The activity variety of SOD in the rice on 15 d after *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryae* be incubated

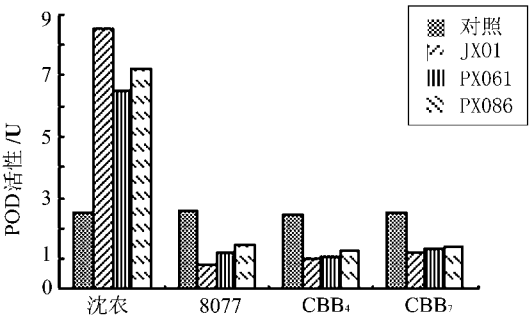


图 2 接种 15 d 水稻 POD 活性变化

Fig 2 The activity variety of POD in the rice on 15 d after *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryae* be incubated

2 结 果

2.1 水稻—白叶枯病菌互作中的细胞保护酶活性变化

按剪叶法接种 JX01, PX061, PX086 3 个小种白叶枯病菌, 接种后 15 d 我们对 4 种水稻中的 SOD、POD 和 CAT 进行了测定, 测定结果见图 1, 2。

图 1 显示 SOD 酶活性变化。其中 JX01、PX061、PX086 分别使沈农 1033 的 SOD 酶活性升高 52.1%、54.6% 和 56.3%。而 JX01、PX061 和 PX086 使 8077、CBB4 和 CBB7 的 SOD 活性分别降低了 38.9%、25.9% 和 30.4%。

从图 2 可以看出, 亲和互作和不亲和互作 POD 活性与对照组比较均有差异, 8077、CBB4 和 CBB7 与 3 种白叶枯病菌不亲和互作后, POD 活性平均分别降低了 38.7%、27.5% 和 19.4%。

对接种后 15 d 的 4 种水稻品种的 CAT 活性测定表明: 对照组 CAT 显示活性, 平均为 15.5 U。而接种 3 种病原菌的水稻均未测出 CAT 活性。

2.2 白叶枯病菌在 NB 培养基和在水稻酶解液中酶的变化

为了了解白叶枯病菌的细胞防御酶活性是否受到水稻的影响, 比较研究了白叶枯病菌在 NB 培养基中和在水稻酶解液中酶活性的变化。

将 3 种白叶枯病菌在 NB 液体培养基中生长至对数期, 然后测定其 SOD、CAT 和 POD 的活性。图 3 显示水稻白叶枯病菌 SOD 和 CAT 均有活性, 且 SOD 活性比 CAT 高, 但 POD 未显示活性。

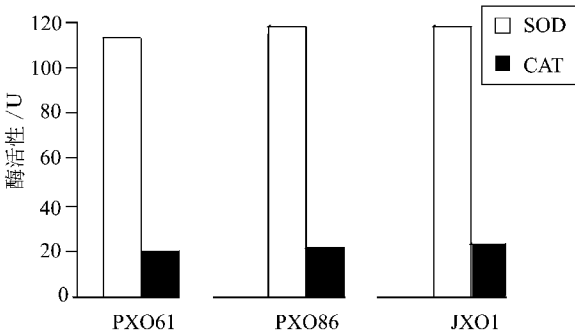


图 3 白叶枯病菌在 NB 培养基中培养后 SOD、CAT 和 POD 的活性

Fig 3 The activity of SOD, CAT and POD from *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryae* after cultured in NB medium

为了了解水稻对白叶枯病菌细胞保护酶的影响, 以酶解液为培养基接种 3 种水稻白叶枯病菌, 培养 6 h 后, 分别测定 3 种病原菌 SOD、POD 和

CAT 活性变化 (图 4, 5)。

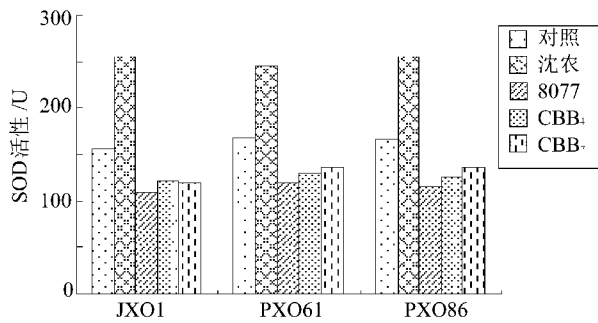


图 4 白叶枯病菌在水稻酶解液中 SOD 活性的变化

Fig 4 The activity variety of SOD in

Xanthomonas oryzae pv. Dryzae after cultured in medium which rice leaf degest by enzymes

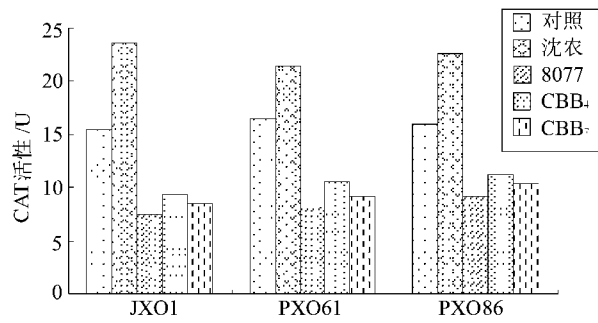


图 5 白叶枯病菌在水稻酶解液中 CAT 活性的变化

Fig 5 The activity variety of CAT in

Xanthomonas oryzae pv. Dryzae after cultured in medium which rice leaf degest by enzymes

与对照相比, 沈农 1033 酶解液使 3 种病原菌的 SOD 和 CAT 活性明显升高。而白叶枯病菌在其他 3 个水稻品种的酶解液中培养后, 其 SOD 和 CAT 活性则下降。其中水稻 8077 酶解液使 3 个病原菌的 SOD、CAT 酶活性下降幅度最大, 平均分别下降了 34% 和 53%。

3 种水稻白叶枯病菌在 4 种水稻酶解液中培养后, 均未测出 POD 活性。

2.3 抗、感水稻对白叶枯病菌 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 水平的影响

图 6, 7 显示 3 种病原菌 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 在水稻酶解液中培养不同时间的动态变化。其结果正好与细胞保护酶相反, 即白叶枯病感病水稻沈农 1033 的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 水平下降, 而抗病水稻 8077、CBB₄、CBB₇ 氧自由基水平上升。

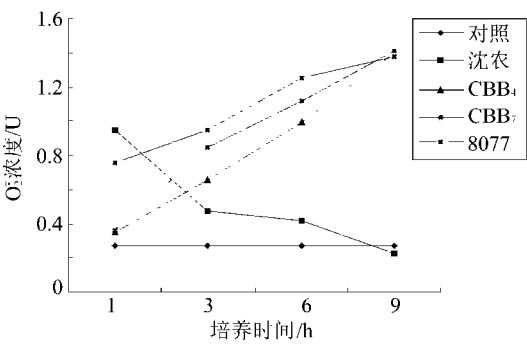


图 6 白叶枯病菌在水稻酶解液中 $O_2^{\cdot-}$ 的变化

Fig 6 The variety of the superoxide anion radical in

Xanthomonas oryzae pv. Dryzae be incubated after cultured medium which the rice leaf degest by enzymes

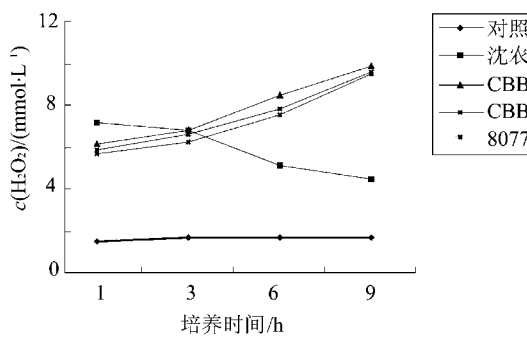


图 7 白叶枯病菌在水稻酶解液中 H_2O_2 的变化

Fig 7 The variety of H_2O_2 from *Xanthomonas oryzae*

pv. Dryzae be incubated after cultured with medium whiche the rice leaf degest by enzymes

3 讨 论

从本文的结果中可以看出, 分别接种 3 种水稻白叶枯病菌后, 抗病水稻叶片中 SOD 和 POD 活性明显降低, 而感病水稻这两种酶的活性则明显提高, 这与王金生等的结果相一致^[1-9], 不同的是抗感水稻均未出现 CAT 活性。分别用抗、感水稻酶解液为基质培养白叶枯病菌, 其菌体对抗、感水稻所表现的反应与水稻叶片表现的相同, 但菌体内只能测出 SOD 和 CAT 活性, POD 未显示活性。在 NB 液体培养基中生长的白叶枯病菌 CAT 均有活性。

我们对白叶枯病菌释放的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的研究结果显示, 非亲和性水稻酶解液中病原菌释放的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量是随培养时间的延长而提高, 而亲和性水稻酶解液中病原菌释放的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的质量浓度则与时间成反比 (图 6, 7)。

水稻对白叶枯病菌的感病和抗病反应是一个复杂的过程, 但不管是感病还是抗病与活性氧含量的高低可能有关^[1,4,9]。根据本研究结果, 我们认为水

稻对白叶枯病菌的感病是由于病原菌与水稻进行的是亲和性反应, 诱导产生的氧自由基少, 同时病原菌本身释放的 O_2^- 和 H_2O_2 也低。这样由于积累的活性氧少而影响水稻植保素的诱导和膜脂过氧化的启动, 影响信号传递从而影响防御相关基因的表达, 最终导致水稻感病。与此相反的是水稻对白叶枯病菌的抗病反应, 这种抗病反应可能是水稻和病原菌共同作用的结果^[2,3], 即病原菌诱导非亲和性水稻产生大量的活性氧, 同时水稻的某些因子反过来又刺激病原菌细胞内产生活性氧, 逐渐使活性氧总量达到一个高水平, 积累的活性氧可直接伤害病原菌。活性氧对白叶枯病菌的伤害可能表现在两个方面, 一方面寄主的某种因子进入病原菌细胞, 抑制 SOD、POD 或 CAT 的活性, 使菌体内活性氧代谢失去平衡, 另一方面寄主和病原菌活性氧相加积累, 导致病原菌处于内外夹攻的状态。此外, 活性氧诱导植物防卫系统的启动, 阻止病原菌的蔓延, 使寄主表现为抗病。

参考文献:

- [1] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 朱友林, 刘纪麟. 细胞水平上水稻对白叶枯病抗性表

现与防卫基因表达关系的研究[J]. 植物病理学报, 1997, 27(3): 250—254.

- [3] 李玉红. 活性氧在植物防卫反应及信号传递中的意义[J]. 农业生物工程学报, 1996, 32: 55—62.
- [4] 王金生. 寄主—病原菌互作[J]. 植物病理学报, 1992, 22: 289—291.
- [5] 吴岳轩, 曾富华, 王荣臣. 杂交稻对白叶枯病的诱导抗性与细胞内防御酶系统关系的初步探讨[J]. 植物病理学报, 1996, 27(3): 127—131.
- [6] ZACHEO G, BLEVE ZACHEO T. Involvement of superoxide dismutase and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Melodogyme incogita* attack[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1988, 32: 313—322.
- [7] 蒋明义, 郭绍川. 渗透胁迫下稻菌中铁催化的膜脂过氧化作用[J]. 植物生理学报, 1996, 22(1): 6—12.
- [8] FRIDOVICH, Superoxide dismutase[J]. Annu Rev Biochem, 1975, 44: 147—159.
- [9] 王爱国. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983, 9: 77—84.
- [10] 波饮诺克. 植物生物化学分析方法[M]. 荆家海等译. 北京: 科学出版社, 1981.
- [11] GIANNOPITIS G N, RIES S K. Superoxide dismutase: purification and qualitative relationship with water-soluble protein in seedling[J]. Plant Pathol, 1997, 59: 315—318.

Study on Relationship Between Rice Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryzae* and Active Oxygen in the Bacteria

LIAO Zhao hui, ZHU Bi feng, LIU An ling

(Yingdong College of Biotechnology, Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong, China)

Abstract: That the relationship between the rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryza* and the cell protective enzymes and active oxygen from the bacteria, using three species of *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryza* and four resistant/susceptible disease rice for samples was studied. The results showed that SOD (superoxide dismutase) and POD (peroxidase) in the rice displayed the enzyme activity on 15 d after incubation, but the CAT (catalase) in the rice displayed not. And SOD and CAT in the thalli showed enzyme activity when three bacteria were cultured in medium with solution of rice leaf digesting by enzyme, but POD not in similar condition. It is different that the susceptible disease rice led SOD and CAT activity in three bacteria to increase, but the resistant of rice to SOD and CAT activity to decrease. However, the effect of resistant/susceptible disease rice to active oxygen in *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryza* is reversed.

Key words: rice; *Xanthomonas oryzae* pv. *Dryza*; active oxygen; cell defense enzyme