

离体筛选的水稻抗纹枯病突变体的生理生化特性分析

敖世恩, 杨 媚, 周而勋, 唐倩菲, 潘汝谦

(华南农业大学植物病理学系, 广东广州 510642)

摘要: 对离体筛选的水稻抗纹枯病突变体(突变型)和未经筛选的原品种(原始型)的愈伤组织经水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 粗毒素处理后 24 h 内的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性以及木质素含量的变化进行了研究。结果表明: 突变型的 PAL、POD 和 PPO 比活性以及木质素含量均明显高于原始型; 8 h 时, PAL、POD、PPO 比活性和木质素含量(D280nm)在突变型和原始型中分别为 5.493 1, 0.022 0, 24.896 6, 2.924 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 2.716 5, 0.009 9, 18.838 7, 1.732 1; 上述 3 种酶活性在突变型中出现波峰的时间一般在 8 h, 早于原始型的 12 h 或更迟。由此说明离体筛选的水稻抗纹枯病突变体的抗病机制与一般抗性品种类似。

关键词: 水稻; 抗病突变体; 生理生化特征; 水稻纹枯病菌; 病原菌毒素

中图分类号: S435.111.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)02-0039-03

Physiological and Biochemical Characterization of in vitro Screened

Rice Somatic Mutants Resistant to Sheath Blight

AO Shi-en, YANG Mei, ZHOU Er-xun, TANG Qian-fei, PAN Ru-qian

(Department of Plant Pathology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Changes in activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO), and contents of lignin in mutant and original rice calli after treated with crude toxin of rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* were investigated in 24 h. The results showed that the activities of PAL, POD and PPO, and contents of lignin in mutant calli were obviously higher than those in original calli; the activities of PAL, POD and PPO, and contents (D280 nm) of lignin in mutant and original calli in 8 h were 5.493 1, 0.022 0, 24.896 6, 2.924 2 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ and 2.716 5, 0.009 9, 18.838 7, 1.732 1, respectively. Furthermore, activity peaks of the above-mentioned three defensive enzymes appeared in mutant calli in 8 h earlier than those appeared in original calli in 12 h or later. These results suggested that in vitro screened rice somatic mutants resistant to sheath blight had the similar resistant mechanism as general resistant varieties.

Key words: rice; resistant mutant; physiological and biochemical characterization; *Rhizoctonia solani*; pathogen toxin

水稻纹枯病 *Rhizoctonia solani* Kühn 是世界性的水稻三大病害之一^[1-3]。该病在我国的发生为害已位居水稻三大病害之首, 给我国水稻生产造成了严重的经济损失^[2-3]。在生产实践中, 栽培抗病品种是最经济有效的防病措施, 但由于目前尚未找到高抗

纹枯病的水稻品种, 故该病的防治目前还主要依靠科学的栽培管理和化学防治, 但防效不理想。因此, 培育抗纹枯病的水稻品种就成为植物遗传育种和植物病理学工作者所面临的一个重大课题。与常规育种方法相比, 利用植物组织培养技术离体筛选抗病

收稿日期: 2005-12-14

作者简介: 敖世恩(1978-), 女, 助理工程师, 硕士, 现在贵州省环境科学研究设计院环境科学咨询中心工作; 通讯作者: 周而勋(1963-), 男, 教授, 博士, E-mail: exzhou@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(39870438); 广东省自然科学基金(950383)

突变体具有简便、快速、省地、易于在人工控制条件下定向选择等优点,是一条可行的抗病育种新途径^[4]。面对近年来我国水稻纹枯病的发生范围不断扩大的趋势以及水稻资源中缺乏相应的抗源、抗病品种甚少的形势,作者以广东省目前生产上大面积推广种植的、综合性状优良的不同水稻品种(系)为材料,利用组织培养技术,以水稻纹枯病菌毒素作为选择剂,获得了抗纹枯病的体细胞突变体^[5]。在此基础上,本文对离体筛选的水稻抗纹枯病突变体的生理生化特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

离体筛选的水稻品种“粤香占”抗纹枯病突变体的愈伤组织(突变型)与未经筛选的原品种的愈伤组织(原始型)、培养基和病原菌粗毒素的制备参见文献^[5]。

1.2 方法

将原始型与突变型愈伤组织分别在体积分数为5.0%的粗毒素的水溶液中浸泡,每隔4 h取样1次,

直到24 h,用清水代替粗毒素作对照。处理后的愈伤组织用于生理生化分析,包括苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性^[6]、过氧化物酶(POD)活性^[7]和多酚氧化酶(PPO)活性^[8]以及木质素含量^[9-10]测定。蛋白质含量测定参照 Bradford^[11]的方法。

所有数据均采用 SAS(statistic analysis system)8.1 版和 Microsoft Excel 2002 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 酶活性的变化

PAL 比活性的变化结果如图 1a 所示。从图 1a 可以看出,无论是用粗毒素还是用清水处理,原始型愈伤组织的 PAL 比活性都低于突变型愈伤组织的 PAL 比活性。突变型愈伤组织经粗毒素处理后,早期的 PAL 活性上升较快,8 h 达到一个高峰($5.493\ 1\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),之后有所下降,但在 16 h 后 PAL 比活性又开始上升,直到 24 h 时仍呈上升趋势。原始型愈伤组织经粗毒素处理后,早期的 PAL 活性变化趋势不稳定,出现上下波动状态,直到 20 h 后才有稳定上升的趋势,但一直低于突变型的 PAL 比活性。

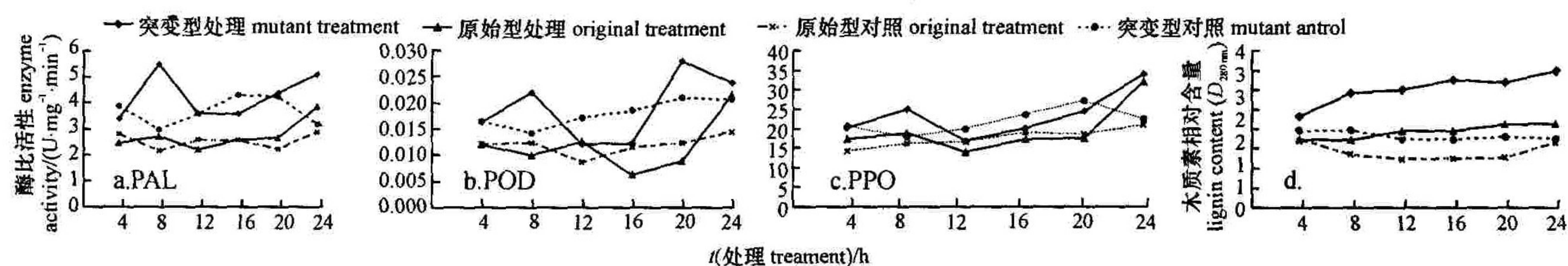


图1 突变型和原始型愈伤组织酶活性和木质素含量的变化

Fig. 1 Change of enzyme activity and lignin content in mutant and original rice callus

POD 比活性的变化结果如图 1b 所示。从图 1b 可以看出,突变型愈伤组织经粗毒素溶液处理后,其 POD 的比活性早期反应快速,8 h 就达到一个高峰($0.022\ 0\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),之后很快下降,且低于其清水对照的 POD 活性水平,16 h 又开始急速上升,到 20 h 达到第 2 个高峰($0.028\ 0\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),明显高于第 1 个高峰值。原始型愈伤组织经粗毒素处理后,其早期的 POD 比活性变化趋势不明显,12 h 有一个微弱的波峰,与突变型的低谷重叠,20 h 后才开始有明显的上升趋势。

PPO 比活性的变化结果如图 1c 所示。从图 1c 可以看出,在粗毒素溶液处理后,早期突变型愈伤组织的 PPO 比活性有轻微的上升趋势并在 8 h 时达到一个高峰($24.896\ 6\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),之后就下降,12 h 时其 PPO 的比活性低于其清水对照的 PPO 的比活性水平,之后有上升的趋势,但比活性水平仍在其清水对照的水平之下。到 20 h 后才高于清水对照的 PPO 活性水平,直到 24 h 时仍呈上升状态。原始型

愈伤组织经粗毒素处理后的 PPO 比活性早期反应不明显,到 20 h 时才有明显的上升趋势,24 h 仍呈上升趋势,且明显高于其清水对照的 PPO 的比活性水平。

2.2 木质素含量的变化

木质素含量的变化结果如图 1d 所示。从图 1d 可以看出,2 种类型的愈伤组织经粗毒素处理后在 24 h 内的变化趋势基本相同都呈上升趋势,但突变型愈伤组织的木质素积累发生得较早,在处理 4~8 h 之间有明显的积累,之后一直呈上升趋势;原始型愈伤组织的木质素积累发生得较晚,木质素的含量在 8 h 后才略有上升,之后虽一直呈上升趋势,但很缓慢。

3 讨论与结论

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物体内苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,对酚类物质和木质素的合成和积累起着关键性的作用。当植物受到病原物侵染时, PAL 活性升高,木质素和植保素开始积累,从而控制病原物的扩展或直接杀死病原物^[12-13]。本

研究表明,原始型与突变型愈伤组织经粗毒素处理后 PAL 比活性都出现了不同程度的上升,但突变型的 PAL 比活性高于原始型的 PAL 比活性,波峰出现也较早,而且其峰值也高于原始型的 PAL 比活性,表明突变型愈伤组织对病原菌毒素的反应较为敏感,激发的防卫反应较为迅速,强度更大。

过氧化物酶(POD)在植物体内将酚类物质氧化成醌类物质,而醌类物质对病原菌具有很高的毒性;POD 同时也参与木质素的合成,而木质素的形成可以阻止病原菌的入侵和扩展;此外,POD 还可催化细胞壁中伸展蛋白和果胶质的胶联以及木质素聚合体的构建,这种胶联和聚合作用可能是真核细胞对外来压力产生抗性的机理之一^[14]。本研究结果表明,突变型的 POD 比活性早期反应快速,并在 24 h 内出现了 2 个波峰,而且其比活性一直高于原始型的 POD 比活性水平。因此从生理生化上证实了本研究筛选获得的抗病突变体是具有抗病性的。

多酚氧化酶(PPO)是植物体内酚类氧化或缩合以及木质素合成的重要酶,许多研究者都将它列为植物抗病性的生理指标。刘正坪等^[15]在茄子黄萎病菌毒素对茄子愈伤组织酶活性影响的研究中指出,PPO 与 PAL 的比活性变化可以作为品种抗性鉴定的生理指标。本研究结果表明,PPO 在突变型愈伤组织与病原菌毒素互作的早期急速上升,波峰明显高于原始型愈伤组织的 PPO 波峰,而且 24 h 内其比活性都一直高于原始型愈伤组织的 PPO 比活性水平,说明本研究筛选获得的抗病突变体具有较强的抵抗病原菌毒素的能力。

木质素是 PAL、POD 和 PPO 等很多防御酶的产物,它能增强细胞壁的厚度,从而限制病原菌的侵入和扩展,其含量与植物的抗病性呈正相关。在本研究中,突变型愈伤组织中的木质素积累发生得较早,而且在 24 h 内一直呈上升趋势,其含量也一直高于原始型愈伤组织中的含量,表明突变体对病原菌毒素有较强的抵抗能力。综上所述,在 PAL、POD 和 PPO 的比活性以及木质素的含量上,水稻突变型愈伤组织发生变化的时间都比原始型愈伤组织来得早,而且其比活性或含量更高,强度更大,说明突变型愈伤组织抵抗水稻纹枯病菌毒素的能力强于原始型愈伤组织。

参考文献:

- [1] LEE F N, RUSH M C. Rice sheath blight: A major rice disease [J]. Plant Disease, 1983, 67(7): 829-832.
- [2] 冯淑杰,周而勋,杨媚. 水稻纹枯病菌生物学和生态学的研究概况[M]//中国植物保护学会. 面向 21 世纪的植物保护发展战略. 北京:中国科学技术出版社, 2001: 232-238.
- [3] 孟庆忠,刘志恒,王鹤影,等. 水稻纹枯病研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(5): 376-381.
- [4] 赵蕾,梁元存,张天宇. 利用致病毒素筛选植物抗病突变体的研究进展[J]. 生物技术, 2001, 11(3): 41-44.
- [5] 敖世恩,杨媚,周而勋,等. 水稻抗纹枯病突变体的离体筛选[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(1): 47-50.
- [6] 曾永三. 豇豆与锈菌互作的生化反应及其与抗性的关系[D]. 广州:华南农业大学资源环境学院, 2000.
- [7] SCHAFFRATH U, SCHEINPFLUG H, REISENDR H J. An elicitor from *Piricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties [J]. Physiol Molecular Plant Pathol, 1995, 46: 293-307.
- [8] CHANDER M S, CHANDRAVADANA M V. Enzymatic properties associated with resistance to powdery mildew in peas [J]. J Hort Sci, 1988, 63(4): 641-643.
- [9] MUSEL G, SCHINDLER T, BERGFELD R, et al. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes [J]. Planta, 1997, 201: 146-159.
- [10] 林葵,黄祥辉,王隆华,等. 甜瓜子叶不定芽分化过程中 PAL 活性和木质素含量变化研究[J]. 华东师范大学学报:自然科学版, 1996(2): 92-97.
- [11] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [12] ASADA Y, MATSUMOTO I. Formation of lignin in the root tissue of Japanese radish affected by *Alternaria japonica* [J]. Phytopathology, 1967, 57: 1 339-1 440.
- [13] FRIEND J, REYNOLDS S B, AVEYARD W A. Phenylalanine ammonia-lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans* [J]. Physiol Plant Pathol, 1973, 3(4): 495-507.
- [14] SANCHO M A, FORCHETT M S, PLIEGO F, et al. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato to suspension cell [J]. Tissue and Organ Culture, 1996, 44: 161-167.
- [15] 刘正坪,赵明敏,周洪友. 茄子黄萎病菌毒素对茄子愈伤组织几种酶活性的影响[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 381-382.

【责任编辑 周志红】