

## 稻瘟菌粗毒素诱导水稻过程中 CAT, PPO 活性和 MDA 含量的变化\*

叶 漪, 范静华, 孟艳妮, 果志华, 陈建斌\*\*  
(云南农业大学植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 利用不同浓度稻瘟菌粗毒素处理水稻幼苗, 研究在不同浓度处理下稻瘟菌粗毒素对水稻种子萌发、水稻叶片中过氧化氢酶 (CAT)、多酚氧化酶 (PPO) 活性、有害物质丙二醛 (MDA) 浓度变化的影响。结果表明, 在 Fries 培养液中培养的粗毒素对水稻种子萌发, 种子胚根、胚芽都有明显的抑制作用。经 0 ~ 96 h 的动态检测, CAT 活性比对照平均提高了 17.5%, PPO 活性比对照平均提高了 13.1%, MDA 的含量比对照平均降低了 15.9%。说明经稻瘟菌粗毒素处理过的水稻能够诱导提高相关酶 CAT, PPO 的活性, 减少有害物质 MDA 的含量。

**关键词:** 水稻; 粗毒素; 多酚氧化酶; 过氧化氢酶; 丙二醛; 诱导

**中图分类号:** S 435.111.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2008) 05-0775-06

### Changes of CAT and PPO Activities and MDA Content of Rice during Induction by Rice Blast Crude Toxin

YE Yi, FAN Jing-hua, MENG Yan-ni, GUO Zhi-hua, CHEN Jian-bin

(Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** The seedlings of rice (*Oryza sativa*) were treated with different concentrations of rice blast crude toxin, extracted from *Pyricularia oryzae*, to study the effect of rice blast crude toxin on the seed germination, the activities of catalase (CAT), poly-phenoloxidase (PPO) and the content of malondialdehyde (MDA) in rice leaves. The results showed that the toxin significantly inhibited the germination rate, shoot and root elongation. During 0 ~ 96 h inspection, compared with the control, the activities of CAT and PPO increased 17.5% and 13.1%, respectively, but the content of MDA decreased 15.9%. It was indicated that low concentration of filtration of rice rice cultivation itself could be used as an inductor to enhance the CAT and PPO activities and reduce the MDA content.

**Key words:** rice; crude toxin; CAT; PPO; MDA; induction

稻瘟病是世界各稻区最具毁灭性的水稻病害之一, 危害面积大, 药剂防治难以得到有效的控制, 利用抗病品种是避免或减轻稻瘟病发生的最有效的途径之一, 培育抗病品种是目前被认为最经济有效的防治方法<sup>[1,2]</sup>。但由于稻瘟菌

生理小种变异快、易流行、不易控制等特点, 往往容易造成品种抗病性丧失, 采用传统育种方法已满足不了生产的需求, 运用致病毒素为选择压的突变体筛选法具有极大的应用潜力和发展前景<sup>[3]</sup>。本试验利用经稻瘟菌粗毒素处

收稿日期: 2008-01-14 修回日期: 2008-02-26 \* \* 通讯作者 E-mail: cjbin2vip@sina.com

\* 基金项目: “973” 前期专项(2003CCA02000)。

作者简介: 叶漪 (1982-), 男, 湖南常德人, 在读硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。

E-mail: yeyi0818@163.com

理的水稻幼苗为材料,通过粗毒素对幼苗的致病力进行测定,并对水稻幼苗防御酶系、膜损伤指标丙二醛进行检测,试图测定在不同浓度粗毒素作用下其生理生化上的变化,以指导粗毒素在抗性筛选中的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

具有不同抗性的水稻感病品种楚粳27和抗病品种汕优63,稻瘟菌株CY-2(均由云南农业大学植物保护学院提供)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 稻瘟菌粗毒素的制备

将稻瘟菌接种在Fries液体培养基中,25℃恒温黑暗静止培养15~20d,过滤获得粗毒素滤液,保存在4℃冰箱内备用<sup>[4]</sup>。

#### 1.2.2 稻瘟菌粗毒素致病力测定

(1)粗毒素对种子萌发的抑制率<sup>[5]</sup>:选取健康无病的水稻种子100粒浸泡在浓度为0.1%的灭菌净中2~4h,再用自来水漂洗后放入盛有毒素浓度梯度(1:10,1:20,1:30,1:40,1:50)处理液的培养皿中,以蒸馏水为对照。每天换液1次,30℃浸泡3d后统计萌芽和未萌芽的种子数,计算粗毒素对种子萌发的抑制率,抑制率(%)=[(CK生长量-处理生长量)×100%]/CK生长量。

(2)粗毒素对水稻胚芽、胚根生长的抑制:取用清水浸泡催芽的种子50粒,放入装有滤纸的培养皿内,每天用相应浓度的粗毒素液浸泡,清水培养作为对照(CK),培养3d后取出,量取胚芽和胚根的长度,计算胚芽、胚根抑制率,抑制率(%)=[(CK生长量-处理生长量)×100%]/CK生长量。

#### 1.2.3 处理和取样

将粗毒素浓度梯度(1:10,1:20,1:30,1:40,1:50)浸根处理水稻幼苗,分别于24,48,72,96h后取样测定,用蒸馏水作对照。

#### 1.2.4 过氧化氢酶(CAT)提取及酶活测定<sup>[6]</sup>

称取0.2g幼苗叶片,加入预冷磷酸缓冲液(pH 7.8)冰浴研磨成匀浆,10000 r/min离心20 min,上清液作为酶提取液。采用紫外分光光度计法测定,在3 mL反应液(2.1 mL 50 mmol/L PBS, pH 7.0, 0.9 mL 15 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)中加入0.15 mL酶液,同时,以不含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应液加酶液作为对照,连续记录240 nm光吸收值的变化,每

1 min读数1次,共测4 min。以每1 min  $\Delta A_{240}$ 内减少0.1的酶量为一个酶活单位(U)。

#### 1.2.5 多酚氧化酶(PPO)提取及酶活测定<sup>[7]</sup>

称取0.2g幼苗叶片,用10 mL 0.1 mol/L pH 6.0磷酸柠檬酸缓冲液冰浴研磨成匀浆,8000 r/min离心10 min,上清液作为酶提取液。吸取3 mL(对照管加3 mL蒸馏水),放入反应体系(8.0 mL磷酸柠檬酸缓冲液,0.6 mL 10 g/L邻苯二酚,0.4 mL 1 g/L脯氨酸)中,2 min后30℃恒温水浴保温10 min,取出后460 nm比色测定4 min。酶活力以每g鲜样光密度每min增加0.01为1个酶活性单位(U)。

#### 1.2.6 丙二醛(MDA)含量测定<sup>[8]</sup>

称取0.2g幼苗叶片,加入5 mL磷酸缓冲液(pH 7.8,内含1% PVP),冰浴研磨匀浆,于2500 g离心10 min,取2 mL上清液与2 mL TBA(20%三氯乙酸,0.5%硫代巴比妥酸)混合。100℃水浴30 min,冷却后再离心(2500 g)10 min,取上清液分别在450,532和600 nm处测消光度值OD<sub>450</sub>,OD<sub>532</sub>,OD<sub>600</sub>,求出样品的MDA含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 粗毒素致病力测定

#### 2.1.1 粗毒素对水稻萌发的抑制率

粗毒素浓度不同,对种子萌发的抑制率不同,浓度越大,种子萌发数就越少,而且对不同品种的抑制率也不同(图1,2)。楚粳27在1:10,1:20,1:30的处理浓度下,其种子萌发率要比汕优63高,但在1:40,1:50两个处理中后者要高于前者,在处理后的第2天接近对照,说明低浓度的粗毒素对水稻种子萌发抑制作用很小。

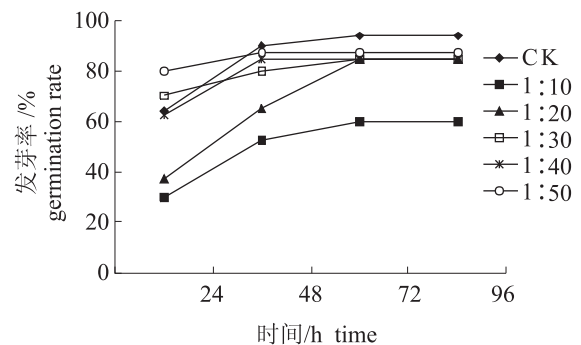


图1 楚粳27发芽率

Fig. 1 Seed germination rate of Chujing27

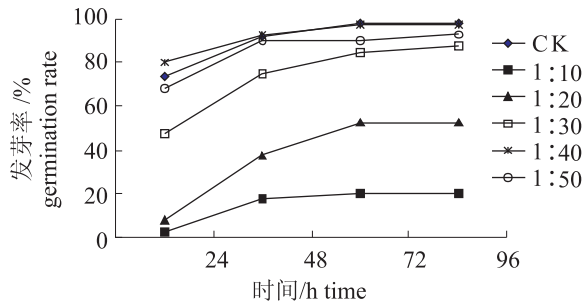


图2 汕优63发芽率

Fig. 2 Seed germination rate of Shanyou63

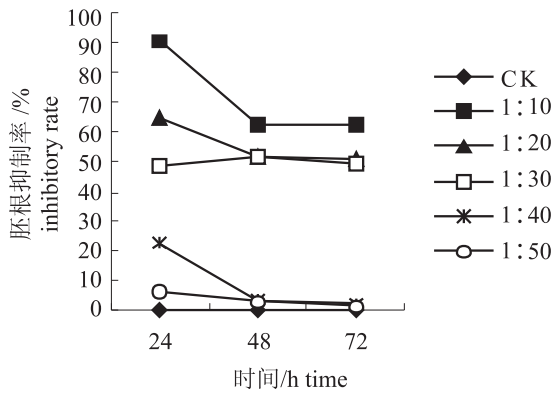


图3 楚粳27胚根抑制率

Fig. 3 Inhibitory rate of toxin to Chujing27 radicles

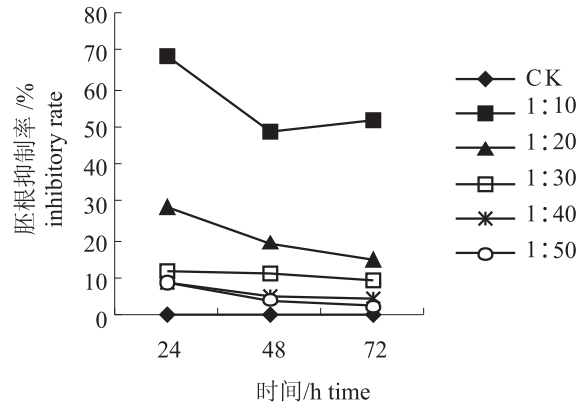


图4 汕优63胚根抑制率

Fig. 4 Inhibitory rate of toxin to Shanyou63 radicles

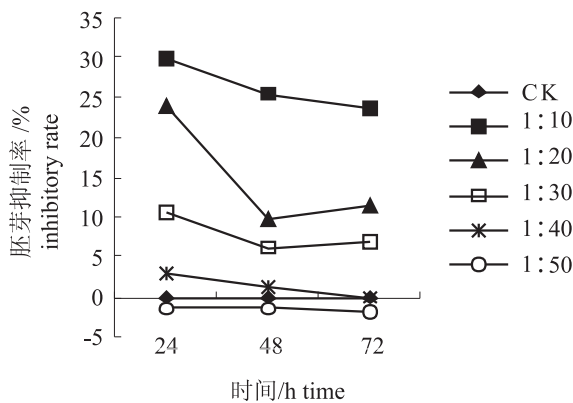


图5 楚粳27胚芽抑制率

Fig. 5 Inhibitory rate of toxin to Chujing27 embryos

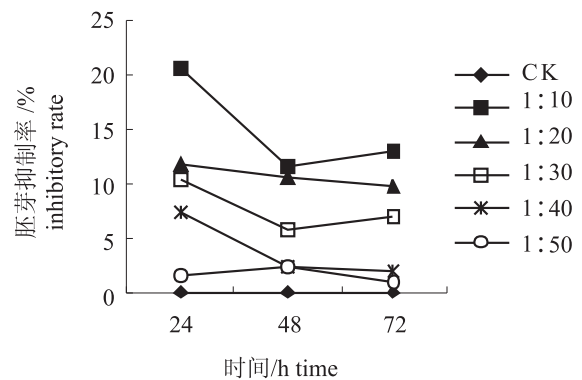


图6 汕优63胚芽抑制率

Fig. 6 Inhibitory rate of toxin to Shanyou63 embryos

2.2 粗毒素对 CAT 活性的动态影响

从图 7, 8 可以看出, 楚粳 27 经粗毒素处理后, 所有处理组中 CAT 活性在 48 h 内迅速上升且在 48 h 时出现峰值, 此时 1:10, 1:40, 1:50 CAT 活性均要高于对照, 48 ~ 72 h 内又迅速下降。经 0 ~ 96 h 的动态检测, CAT 活性比对照平均提高了

2.1.2 粗毒素对胚根, 胚芽的影响

从图 3, 4 可以看出 1:10 的处理浓度其抑制率最强, 1:50 的最弱, 说明粗毒素对根芽的生长有一定的抑制作用, 这种抑制作用与粗毒素浓度呈正相相关, 即抑制率随着毒素浓度的增加而增大。从两个品种的胚根胚芽抑制率来看, 汕优 63 比楚粳 27 表现出更高的抗性。

17.5%。而汕优 63 的 1:10, 1:20, 1:30 这三个处理组 CAT 活性在 48 h 内达到峰值且高于对照然后迅速下降, 1:40, 1:50 和对照在 72 h 内一直呈上升的趋势, 并在 72 h 出现峰值, 说明粗毒素对汕优 63 的 CAT 活性影响不如楚粳 - 27 明显, 这可能与汕优 63 自身高抗性有关。

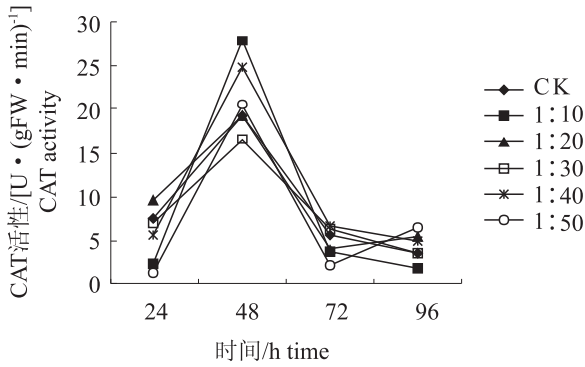


图 7 粗毒素对楚梗27 CAT 活性影响图  
Fig. 7 Changes of CAT activities of Chujing27 leaves treated with toxin

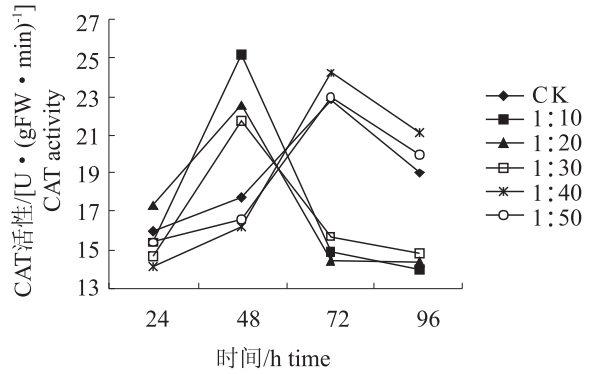


图 8 粗毒素对汕优63 CAT 活性影响图  
Fig. 8 Changes of CAT activities of Shanyou63 leaves treated with toxin

2.3 粗毒素对 PPO 活性的动态影响

图 9, 10 表明, 楚梗 27, 汕优 63 经粗毒素处理后 PPO 活性均有所上升。在 24 ~ 96 h 内, 1:10, 1:20, 1:30 处理组中 PPO 活性呈现起伏, 分别在 96 h, 48 h 时出现峰值, 而 1:40, 1:50 PPO 活性在 72 h 时达到峰值, 此时比对照分别上升了 16.7% 和 6.9%, 然后迅速下降。在 0 ~ 96 h 内不论 PPO 活性如何变化, 1:40, 1:50 两个处理

组中的 PPO 活性均要高于未经粗毒素处理过的对照, 楚梗 -27 比对照上升了 20.2% 和 9.4%, 汕优 63 比对照上升了 13.1% 和 4.4%, 说明低浓度粗毒素对 PPO 酶活性有较强的刺激作用, 够提高水稻叶片中 PPO 酶活性。结果显示粗毒素处理的楚梗 27 的 PPO 活性上升幅度大于汕优 63, 可能是因为汕优 63 自身比较耐毒, 对毒素处理不敏感所致。

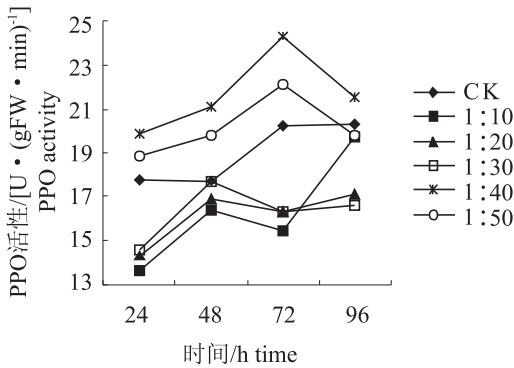


图 9 粗毒素对楚梗27 PPO活性的影响  
Fig. 9 Changes of PPO activities of Chujing27 leaves treated with toxin

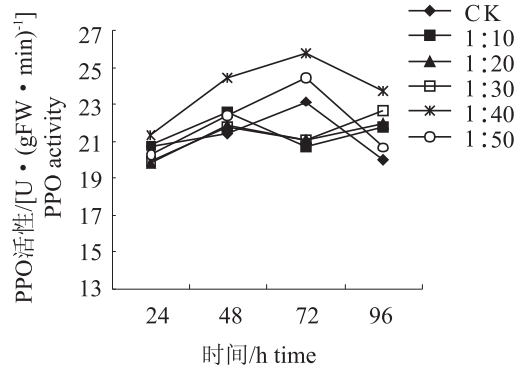


图 10 毒素对汕优63 PPO活性的影响  
Fig. 10 Changes of PPO activities of Shanyou63 leaves treated with toxin

2.4 粗毒素对 MDA 含量的动态影响

在 0 ~ 96 h 内, 1:40, 1:50 的处理浓度下叶片中有害物质 MDA 的含量均要低于未经处理过的对照, 而高浓度处理过的叶片中 MDA 的含量要高与对照 (图 11, 12), 并都在 72 h 时出现峰值。本试验以 1:40 的低浓度粗毒素处理效果最好。经 0 ~ 96 h 的动态检测, 楚梗 27 MDA 含量比

对照平均下降了 17.8%, 汕优 63 MDA 含量比对照平均下降了 14.1%。以上证实, 低浓度粗毒素对水稻起到了抑制自身有害物质产生的病理过程, 从而提高了抗病能力, 而高浓度粗毒素作用相反, 使有害物质 MDA 含量增加。在同等浓度处理下, 楚梗 27 的 MDA 含量要比汕优 63 高, 说明 MDA 生成量与品种的抗性高低有关, 且呈负相关, 汕优 63 比楚梗 27 更耐抗。

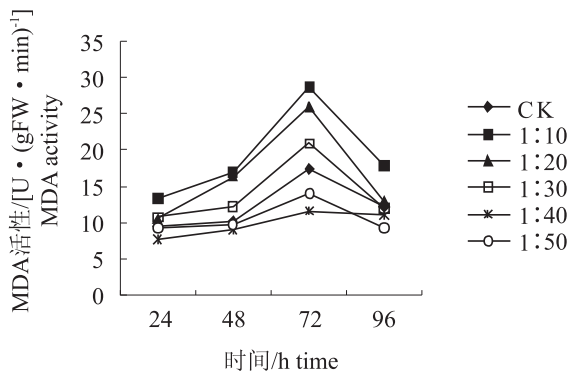


图 11 粗毒素对楚粳27 MDA含量影响

Fig. 11 Changes of MDA content of Chujing 27 leaves treated with toxin

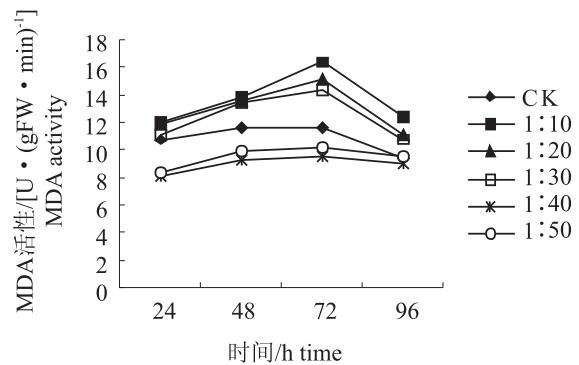


图 12 粗毒素对汕优63 MDA含量影响

Fig. 12 Changes of MDA content of Sanyou 63 leaves treated with toxin

### 3 结论与讨论

植物诱导抗病性是指植物在诱导因子作用下, 产生能抵抗原来不能抵抗的病原物的侵染的一种抗病性能, 或称获得免疫性。据报道, 经稻瘟病弱致病菌诱导处理后, 水稻的防御功能对于多种病原物都有一定作用, 其诱导抗菌谱包括真菌、细菌等<sup>[9]</sup>。

CAT 是一类含有血红素辅基的四聚体酶, 主要生理功能是清除生物体内的活性氧  $O_2^-$  和  $H_2O_2$ , 从而防止自由基的毒害, 与 SOD, POD 一起被称为酶保护系统<sup>[10-12]</sup>。因此, CAT 的活性下降必然导致染病组织活性氧的累积和膜脂过氧化的加强, 进而加速组织细胞的死亡和病症表现<sup>[13-14]</sup>; CAT 酶活性提高, 使活性氧和自由基维持在较低的水平, 保证植物得以进行正常的生长和代谢。通过实验发现, 低浓度粗毒素能够诱导水稻提高 CAT 酶的清除活性氧  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的能力, 从一定程度上消除或减轻了活性氧对水稻产生的伤害, 而且清除能力与水稻品种抗性高低相关, 从试验结果可以看出, 汕优 63 的 CAT 活性水平总体上比楚粳 27 的低, 这说明在低浓度粗毒素诱导下水稻的抗病性与 CAT 的活性之间存在负相关的关系。

植物受到病原物侵染时, 会从莽草酸途径或乙酸途径合成大量酚, PPO 可将酚氧化成对病原菌有毒害作用的醌类物质, 也可形成木质素的前体物——预苯酸, 起到修复伤口, 抑制病原物扩展的作用, 能够减少病原菌对植物的损伤。ZENG 等发现对锈病免疫和高抗的豇豆品种 PPO 活性高

于感病品种, 且活性高峰出现比感病品种早<sup>[15]</sup>。本试验中汕优 63 平均活性要高于楚粳 27, 整体上升幅度要小于楚粳 27, 表明 PPO 在低浓度粗毒素诱导水稻的抗病反应中起到一定的作用, 这与水稻抗性高低明显相关。

MDA 是膜脂过氧化的主要产物, 是反映植物体膜脂过氧化强弱, 膜损伤程度的一个重要指标<sup>[10]</sup>, 它对细胞有毒性, 能够引起细胞膜功能紊乱, 且对许多功能分子有破坏作用, 可使感染病原菌的细胞组织膜系统遭到破坏, 从而导致细胞坏死。因此, MDA 含量增加是植物细胞损伤的直接原因。通过粗毒素诱导水稻的 MDA 含量的测定发现, 低浓度粗毒素可以降低 MDA 的生成量。这说明在低浓度粗毒素下能延缓活性氧的积累, 从而抑制或延缓活性氧引发的膜脂过氧化及其它正常代谢活动的紊乱, 降低对植物细胞的损害。本试验还说明在同等浓度粗毒素处理下抗病品种汕优 63 与感病品种楚粳 27 MDA 含量有一定差异, 前者高于后者。

本试验以稻瘟菌粗毒素对水稻生理生化的影响作为宏观依据, 所制备的粗毒素对水稻种子萌发, 胚芽、胚根的生长都显示了较大抑制作用, 说明粗毒素具有一定的致病力, 可以用它作为选择压筛选抗病突变体。目前运用致病毒素对水稻进行抗稻瘟病突变体筛选已有许多成功报道<sup>[16]</sup>。试验多次重复证实, 低浓度粗毒素浸根预处理, 可以提高水稻抗稻瘟病相关酶的活性。本试验测定了叶片内与抗病相关的生化指标 CAT 和 PPO 与 MDA 等物质活性与含量的动态变化, 结果表明 CAT, PPO 活性分别比对照平均提高了 17.5%,

13.1%；MDA 含量比对照平均降低了 15.9%，说明经低浓度粗毒素处理水稻能够诱导提高相关酶 CAT, PPO 的活性，减少有害物质 MDA 含量，从而提高植物对病原菌的抗病性，减少对病原菌感染的损害。研究表明激活酶活性高低也与水稻品种抗病性相关。病原菌毒素是病原菌的致病因子之一，在适当的浓度下也可作为激活植物抗病机制的诱抗剂，用低浓度粗毒素激发水稻抗病性的机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 李香顺, 姜浩, 金石芬, 等. 1998 年吉林省水稻稻瘟病大流行情况调查报告 [J]. 延边大学农学学报, 1999, 21 (2): 155-158.
- [2] KOZAKA T, TSUCHIZAWA M, HANAVE M, et al. . Phytotoxin Glycopeptide Inducing White Jead of Rice Plant Produced by *Pyricularia oryzae* Cav Am [J]. Phtopath Soc. Japan, 1985, 5 (2): 199-204.
- [3] 陈启峰, 陈璋, 王金陵. 运用致病毒素筛选抗稻瘟质细胞突变体 [J]. 遗传学报, 1993, 20 (4): 340-347.
- [4] 董金皋, 李树正. 植物病原菌毒素研究进展 (第一卷) [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1997.
- [5] 张君成, 韦绍兴, 张超冲. 稻瘟菌粗毒素的定量生物测定方法研究 [J]. 河北农业大学学报, 1996, 19 (3): 24-28.
- [6] 赵亚华. 生物化学实验技术教程 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000.
- [7] 魏国强, 朱祝军, 钱琼秋, 等. 硅对瓠瓜酚类物质代谢的影响及与抗白粉病的关系 [J]. 植物保护学报, 2004, 31 (2): 185-189.
- [8] 张宪政. 作物生理研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [9] 范静华, 周惠萍, 王洪珍, 等. 稻瘟菌诱导的广谱性 [J]. 云南农业大学学报, 2004, 19 (2): 156-160.
- [10] 刘德立, 禹邦超, 孙义勇, 等. 低温对水稻幼苗 SOD 和 CAT 活性及其同工酶的影响 [J]. 华中师范大学学报, 1994, 28 (4): 525-528.
- [11] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制 [J]. 生物工程学报, 2001, 17 (2): 121-124.
- [12] 冯晴, 徐朗莱, 叶茂炳, 等. 麦叶片衰老过程中 CAT 和 APX 的活力及其同工酶的变化 [J]. 南京农业大学学报, 1997, 20 (2): 95-99.
- [13] BOWLER C, VAN MONTAGU M, Inze D. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance [J]. Annu. Rev. Plant Physiol., 1992, 43: 83-116.
- [14] TZENG D D, DEVAY J E. Role of Oxygen Radicals in Plant Disease Development [J]. Adv. Plant Pathology, 1993, 10: 1-34.
- [15] ZENG Y S, WANG Z Z. Relationships Between Activities of Polyphenol Oxidase and Peroxidase, and Resistance of Cowpea to *Uromyces Vignae* (in Chinese) [J]. Acta Phytologica Sinica (植物保护学报), 2004, 31 (2): 145-149.
- [16] 庞冬辉, 岑秀芬. 病原菌毒素诱导水稻抗稻瘟病突变体初探 [J]. 广西农业科学, 1995, (1): 6-9.