

# 外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和木质素积累在镍诱导的水稻对白叶枯病系统抗性中的作用

王海华, 谭新中, 彭喜旭, 胡耀军, 唐新科, 周平兰, 冯涛

(湖南科技大学生命科学院, 湖南湘潭 411201)

**摘要:** 【目的】植物外质体是病原入侵的结构和生理性屏障。本文研究外质体反应在镍诱导的、对白叶枯病系统抗性中的作用, 以探讨植物对病原和重金属交叉抗性的生理机制。【方法】以 0.5、1.0 和 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 硝酸镍喷施三叶期水稻幼苗的第二叶及以下部位, 3 d 后在未处理的第三叶接种稻白叶枯菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*), 接种后 12 d 调查病情。测定了 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 镍处理或/和 *Xoo* 接种的幼苗第三叶外质体中愈创木酚 POD (G-POD)、NADH-POD、二胺氧化酶 (DAO) 活性、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和木质素含量。【结果】镍诱导了幼苗对白叶枯病的系统抗性, 其中 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 镍的诱导效果最佳。镍处理下, 第三叶外质体液 (AWF) 中和细胞壁结合的 G-POD、NADH-POD, 以及 AWF 中 DAO 的活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平快速上升, 木质素含量显著提高; 镍诱导且接种组中, 上述指标均明显高于未诱导但接种组。另外, 产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 POD 的抑制剂 NaN<sub>3</sub> 降低了镍诱导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累水平和对白叶枯病的系统诱抗效应, 而 NADPH 氧化酶抑制剂 (diphenyleneiodonium chloride) 预处理则无明显影响。【结论】本研究结果提示, NADH-POD 和 DAO 活性上升是镍诱导外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生的原因; 外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和木质素在细胞壁中的积累可能参与了镍诱导的水稻对白叶枯病系统抗性的建立。

**关键词:** 外质体; 过氧化物酶; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 系统抗性; 白叶枯病; 镍; 水稻 (*Oryza sativa*)

## The Role of Apoplastic Hydrogen Peroxide and Lignin Accumulation in the Systemic Resistance of Rice to Bacterial Blight Induced by Nickel

WANG Hai-hua, TAN Xin-zhong, PENG Xi-xu, HU Yao-jun, TANG Xin-ke, ZHOU Ping-lan, FENG Tao

(School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, Hunan)

**Abstract:** 【Objective】 Apoplast in plants acts as the structural and physiological barrier against pathogen attacks. In present paper, the role of apoplastic responses in the systemic resistance of rice seedlings to bacterial blight induced by nickel were investigated so as to explore the physiological mechanisms involved in the cross-resistance to pathogens and heavy metals. 【Method】 The second leaf and its lower parts of three-leaf stage rice seedlings were sprayed with nitrate nickel at 0.5, 1.0 and 2.0 mmol L<sup>-1</sup>. The untreated third leaf was inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) 3 d after spraying, and the disease symptoms were evaluated 12 d after inoculation. The activities of apoplastic guaiacol peroxidase (G-POD), NADH-POD, diamine oxidase (DAO) and the contents of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lignin were determined in the third leaves of seedlings treated with 2.0 mmol L<sup>-1</sup> nickel or/and inoculated with *Xoo*. 【Result】 The systemic resistance of seedlings to bacterial blight was induced by nickel. The best induction effect occurred at 2.0 mmol L<sup>-1</sup> nickel. Nickel not only led to the enhancement in the activities of G-POD and NADH-POD, which are present in apoplastic water fluid (AWF) and are associated with cell wall, but also the enhancement in DAO activity in AWF. Concurrently, a rapid increase in apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level and a significant increase in lignin content were also observed in treatment with nickel. On the other hand, the parameters mentioned above in the nickel-induced and *Xoo*-inoculated seedlings were

收稿日期: 2009-05-18; 接受日期: 2009-11-19

基金项目: 国家“863”计划 (2005AA219040)、湖南省教育厅项目 (B30430)

作者简介: 第一作者和通信作者王海华, 教授, 博士。Tel: 0731-58291416; E-mail: haihuawxt@163.com。通信作者冯涛, 教授, 博士。Tel: 0731-58291416; E-mail: taofhnust@163.com

always higher than those in the non-induced but *Xoo*-inoculated ones. Additionally,  $\text{NaN}_3$ , an inhibitor of PODs mediating in apoplastic  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation, compromised the  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation and systemic resistance against bacterial blight induced by nickel. However, diphenyleioidonium chloride, an inhibitor of NADPH oxidase, exerted no effects on them. 【Conclusion】 The results suggest that the increase in the activities of NADH-POD and DAO contributes to the production of apoplastic  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced by nickel, and the rapid enhancement in apoplastic  $\text{H}_2\text{O}_2$  level and lignin accumulation in cell wall may be involved in the systemic resistance to bacterial blight induced by nickel.

Key words: apoplast; peroxidase;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; systemic resistance; bacterial blight; nickel; rice (*Oryza sativa*)

## 0 引言

【研究意义】硝酸镍是一种有效的抗白叶枯病的诱导剂<sup>[1-2]</sup>。虽然作为重金属的镍超过一定的浓度对植物产生毒害,并且污染环境,硝酸镍这种抗病诱导剂很难达到应用的标准,但对其诱导抗病机理的研究还是必要的。植物响应病原侵染和非生物胁迫的一些早期事件很可能发生在细胞的外质体中。这些信息有助于加深理解植物对病原和重金属交叉抗性的生理机制,同时可为抗病诱导剂的筛选提供理论依据。【前人研究进展】植物细胞外质体(apoplast)是包括细胞壁在内、细胞壁与质膜之间的细胞区隔,由糖、蛋白质、木质素、代谢物、无机物及水组成,不仅在细胞营养、代谢、生长与分化中起重要作用,而且参与植物对病原、盐、 $\text{O}_3$ 等多种胁迫的反应<sup>[3]</sup>。上述激发子或刺激因素能诱导外质体中包括 $\text{O}_2^-$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 在内的活性氧(ROS)产生。证据表明, $\text{H}_2\text{O}_2$ 参与细胞壁木质化,还可作为信号分子调节防卫基因的表达、植保素的合成以及系统获得抗性(SAR)的建立<sup>[4]</sup>。几类酶促反应参与了外质体中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生。一类是定位在质膜上的NADPH氧化酶,以NADPH为电子供体催化分子氧的单电子还原产生 $\text{O}_2^-$ ,随后被超氧化物歧化酶转变成 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[5]</sup>。另一类是过氧化物酶(POD)。不同的植物与病原/激发子互作体系中采取其中的一种机制,或者两种机制的组合<sup>[6-7]</sup>。另外,外质体中二胺氧化酶(DAO)催化腐胺等物质氧化脱氨的过程中,也产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,可能构成外质体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的来源<sup>[8]</sup>。过氧化物酶(POD)是一类含血红素的单体蛋白,没有严格的底物特异性,广泛分布于各种亚细胞区隔中。在植物细胞的外质体中,它利用各种不同的氢供体分子,如酚类物质和生长素的代谢物作为底物,降解 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,参与木质化和次生细胞壁的形成。另外,部分POD还具有氧化酶的活性,氧化NADH、某些酚类和巯基化合物,产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[9]</sup>。在这种意义上,它是双功能酶。其中,NADH-POD又称NADH氧化酶。该酶与细胞

壁结合,或游离于细胞壁与质膜之间的基质中。植物在非生物胁迫下或与病原互作中,NADH-POD的活性上升是外质体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生的部分原因<sup>[10-11]</sup>。大量的证据表明,外质体POD在植物防卫反应中起重要作用,它与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 参与了木质素合成的最后步骤和糖蛋白或其它成分与细胞壁的氧化交联。在植物与病原或激发子的非亲和互作中,常常观察到外质体中某些POD同工酶活性增强,并伴随着木质素单体物质在细胞壁部位聚集,病原的扩散受阻<sup>[12]</sup>。最近,Bindschedler等<sup>[13]</sup>发现,在尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)细胞壁激发子与拟南芥悬浮细胞的互作中, $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生与细胞壁POD的活性密切相关,转反义POD基因的植株中,胞外 $\text{H}_2\text{O}_2$ 水平降低,同时对多种病原的抗性也明显降低。植物对重金属与病害侵染的反应有共同的生理生化事件,在信号途径中也存在“cross talking”<sup>[14]</sup>,其中之一可能是ROS的产生与积累。但是,重金属与生物胁迫下ROS产生所依赖的酶促与非酶促机制可能有所不同。外质体作为植物感受和响应生物或非生物信号的最前线,同时也是重金属(如镍、镉和锌)在叶中优先积累的位点<sup>[15]</sup>。【本研究切入点】目前有关重金属引发的、外质体ROS的产生与诱导抗病性之间的关系未见报道。王海华等<sup>[16]</sup>就硝酸镍诱导下水稻抗氧化酶活性的动态变化、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 积累与局部诱导抗病的关系做了探讨。【拟解决的关键问题】本文研究水稻叶外质体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和木质素在硝酸镍诱导的白叶枯病系统抗性中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻培养与处理

水稻组合汕优63,由国家杂交水稻研究中心提供。培养方法参考文献[1]。用0(对照)、0.5、1.0和2.0 mmol·L<sup>-1</sup>硝酸镍(含0.05%吐温20)喷雾处理三叶期幼苗的第二叶及以下部位。

### 1.2 细菌培养与剪叶接种

稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)

76-25 生理小种为湖南农业大学罗宽教授惠赠。细菌培养与剪叶接种参照文献[1]。硝酸镍处理 3 d 后, 于第三叶剪叶接种, 12 d 后观察病情。

### 1.3 接种叶片 *Xoo* 菌落形成单位 (CFU) 的测定

取 3 个叶片合为一个样本, 用打孔器将叶片病斑部分制成 0.28 cm<sup>2</sup> 的叶圆片, 加入至盛有无菌蒸馏水的三角瓶中, 在摇床上 200 r/min 振荡 30 min。取菌液梯度稀释, 涂布在含 25 μg·mL<sup>-1</sup> 制霉菌素和 50 μg·mL<sup>-1</sup> 氨基青霉素的肋本哲氏培养基平板上。采用菌落法计数, 只统计具有典型稻白叶枯菌培养特征的细菌。以每 cm<sup>2</sup> 叶面积的 CFU 表示。

### 1.4 外质体液 (apoplast washing fluid, AWF) 和细胞壁成分的制备

AWF 的制备和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 的抽提、酶活性测定均按 Reimers 等<sup>[12]</sup>的方法。在同一处理中, 计算 AWF 中 G6PDH 活性与细胞中总活性的百分比, 以判断 AWF 受细胞质污染的程度。

1 g 叶片用液氮研磨后, 加入 5 mL 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 5.8), 4℃ 1 000×g 离心 10 min, 用同样的缓冲液洗几次, 沉淀即为细胞壁成分。随即加入 1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 室温下在摇床上轻轻摇荡 2 h, 4℃ 1 000×g 离心 10 min, 上清液为离子结合型的细胞壁成分。沉淀用蒸馏水洗 3 次后, 在含 0.01% 果胶酶和 0.1% 纤维素酶的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 (pH 5.5) 中室温处理过夜, 4℃ 1 000×g 离心 10 min, 上清液为共价结合型的细胞壁成分。

### 1.5 酶活性分析

愈创木酚 POD (G-POD) 活性测定按文献[17]的方法。NADH-POD 活性测定参照 Bestwick 等<sup>[18]</sup>的方法。二胺氧化酶 (DAO) 活性测定按 Naik 等<sup>[19]</sup>的方法, 一个活力单位定义为每小时增加 1.0 个 A<sub>510</sub>。蛋白质含量按 Bradford 的方法<sup>[20]</sup>测定。

### 1.6 AWF 中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定

采用 Fe<sup>3+</sup>-二甲酚橙法<sup>[21-22]</sup>。新鲜配制溶液 A: 25 mmol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>, 25 mmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶解在 2.5 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中; 溶液 B: 125 μmol·L<sup>-1</sup> 二甲酚橙 (Sigma), 125 mmol·L<sup>-1</sup> 山梨醇。溶液 A 与 B 以 1:100 的比例混合, 制备反应液, 稳定 6—8 h 后备用。200 μL AWF 与 2 mL 反应液混合, 室温下反应 30 min, 以制备 AWF 的缓冲液为空白对照, 于 560 nm 处测吸收值。

### 1.7 木质素含量测定

木质素含量测定参考 Müsel 等<sup>[23]</sup>的方法。

## 1.8 统计分析

数据以 3 次独立试验的平均值±SE 表示 (n=6)。采用 SPSS 11.5 软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行方差分析, 最小显著差异性检验 (LSD 法) (P<0.05)。

## 2 结果

### 2.1 硝酸镍诱导的水稻对白叶枯病的系统抗性

用不同浓度的硝酸镍对幼苗的第二叶及以下部位进行喷施, 3 d 后在第三叶接种 *Xoo*, 于接种后不同天数调查叶片中细菌的生长情况。结果表明, 对照的细菌繁殖数量 (以 CFU 计) 在接种后 1—9 d 内持续增加, 其后缓慢下降; 硝酸镍处理并没有改变 CFU 随时间变化的趋势, 但明显降低了 CFU 数值 (接种后第 1 天除外)。从浓度效应看, 在接种后 1—3 d, CFU 在 3 个硝酸镍浓度间无明显差异; 但到第 6—12 天, 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 硝酸镍处理的幼苗, 第三叶的 CFU 明显比其它 2 个浓度处理的要小, 而从总体上看, 虽然 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 硝酸镍处理的 CFU 比 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 小, 但两者间无统计意义上的差异 (P<0.05) (图 1-A)。

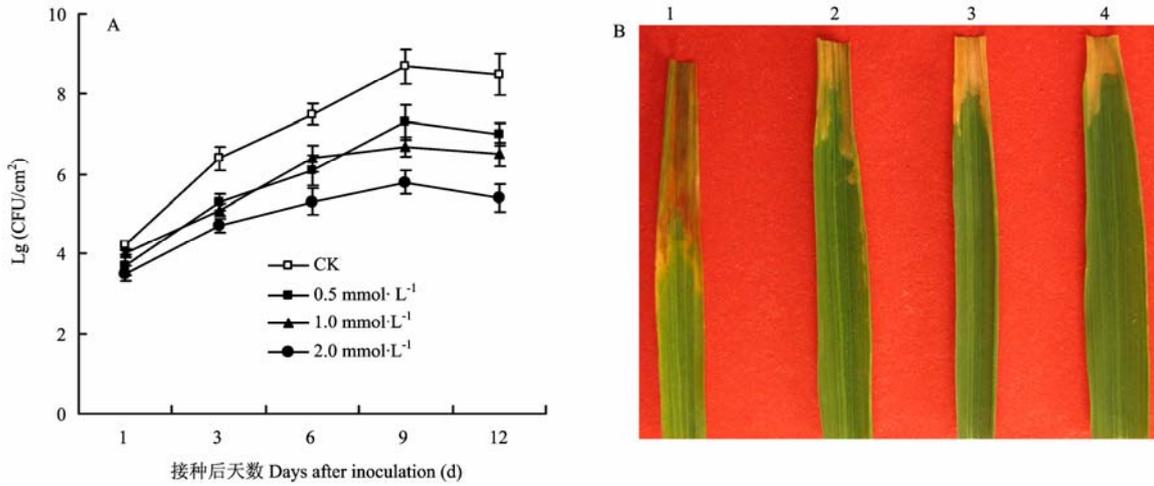
叶中 CFU 间的差异反映在病情发生上。如图 1-B 所示, 随硝酸镍浓度增加, 病斑的长度减小。该浓度范围的硝酸镍对 *Xoo* 只有轻微的抑菌作用<sup>[1]</sup>, 说明硝酸镍诱导水稻产生了对白叶枯病的系统抗性。另外, 用同样浓度的硝酸钾和硝酸锰喷施, 发现无诱导抗性产生 (结果未显示), 表明硝酸镍的诱导抗性是其中的镍在发挥作用。选用最佳诱导浓度 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 的硝酸镍 (以下简称镍) 进行下步的试验。

### 2.2 镍处理和 *Xoo* 接种后 AWF 和细胞壁 G-POD 的活性变化

G6PDH 是细胞质的标志酶。为了监测制备过程中 AWF 受细胞质污染的程度, 测定了细胞中总 G6PDH 活性和 AWF 中的活性, 发现各处理各个时间点 AWF 中 G6PDH 的活性占总酶的 0.8%—1.1% (数据未列出), 说明制备的 AWF 受细胞质污染的程度较小。

接种 *Xoo* 前, 第三叶 AWF 中 G-POD (图 2-A) 和细胞壁共价结合型 G-POD (图 2-C) 的活性在镍处理下的变化趋势相似: 镍处理后 4 h 活性开始上升, 12 h 至最大值, 其后缓慢下降; 镍同样诱导了细胞壁离子结合型 G-POD (图 2-B) 的活性, 不同的是峰值出现在处理后的 24 h, 其后活性陡然下降。至镍处理后 72 h, 3 种 POD 的活性仍明显高于对照。

图 2 亦反映镍诱导处理 3 d 后接种 *Xoo* 对 G-POD



第三叶接种后的细菌生长数 (A) 和 12 d 后的病斑 (B)。B 中 1、2、3 和 4 道分别代表 0 (对照)、0.5、1.0 和 2.0 mmol L<sup>-1</sup> 硝酸镍处理。数据以平均值±SD 表示 (n=6)。下图的统计分析同图 1  
 Pathogen growing numbers of the third leaf at different days (A) or lesions at 12 d (B) post inoculation were investigated. 1, 2, 3, and 4 in B indicate treatments with 0 (Control), 0.5, 1.0 and 2.0 mmol L<sup>-1</sup> nickel nitrate, respectively. Data are expressed as means ± SD (n=6). The statistical analyses of following figures are the same as Fig. 1

图 1 镍诱导的水稻幼苗对白叶枯病的系统抗性

Fig. 1 Systemic resistance of rice seedlings to bacterial blight induced by nickel

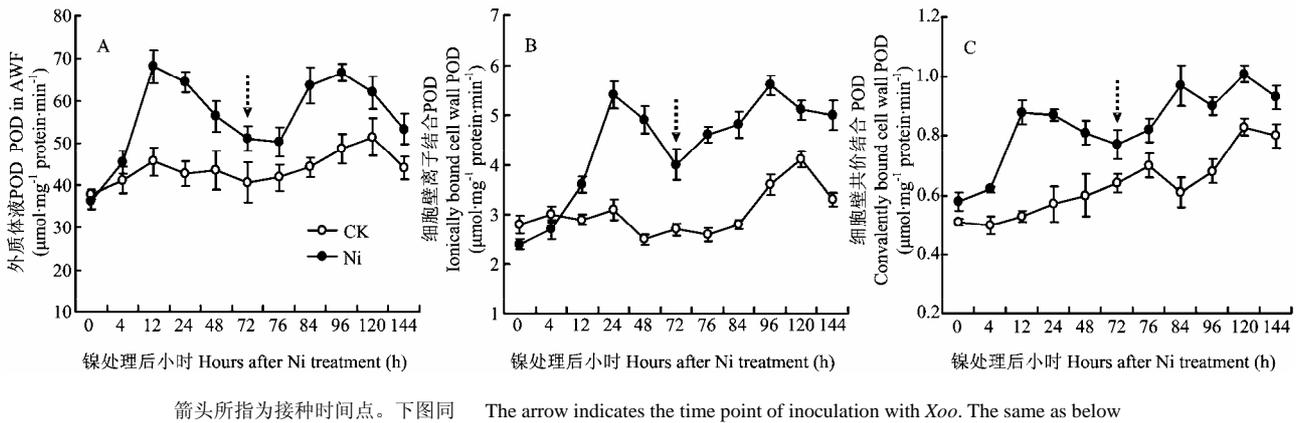


图 2 镍处理和 Xoo 接种后幼苗第三叶外质体 POD 活性的变化

Fig. 2 Changes in the apoplastic POD activities of the third leaf of the seedlings after nickel treatment and inoculation with Xoo

活性的影响。在未诱导但接种组中，AWF-POD 和细胞壁离子结合型 G-POD 的活性在接种后一直缓慢上升，至接种后 48 h 形成一个小峰，然后迅速下降；而细胞壁共价结合型 G-POD 的活性在接种后 4 h 和 48 h 分别形成 2 个小峰，随后缓慢下降。镍诱导且接种 Xoo 后，上述 3 种 POD 的活性均明显高于未诱导但接种组。  
 2.3 镍处理和 Xoo 接种后 NADH-POD 和二胺氧化酶 (DAO) 的活性变化

测定了 AWF 中细胞壁结合 (离子型和共价型) 的 NADPH-POD 活性，三者之和表示外质体中总酶活

性。从图 3 可以看出，接种前，镍诱导外质体 NADH-POD 总酶活性迅速上升，12 h 至最大值，然后平缓下降，但活性仍维持在对照的 5.0—6.6 倍。接种后，在镍诱导组中，NADH-POD 的活性无明显变化；而未诱导但接种组中，该酶的活性在接种后 24 h 时至最大值。但在整个测定的时间范围内，镍诱导且接种组的 NADH-POD 活性显著高于未诱导但接种组。

接种前，DAO 活性在镍诱导后 0—4 h 缓慢上升，随之迅速上升，至 24 h 达峰值，然后迅速下降；接种后，镍诱导组的 DAO 活性几乎无变化，而未诱导但

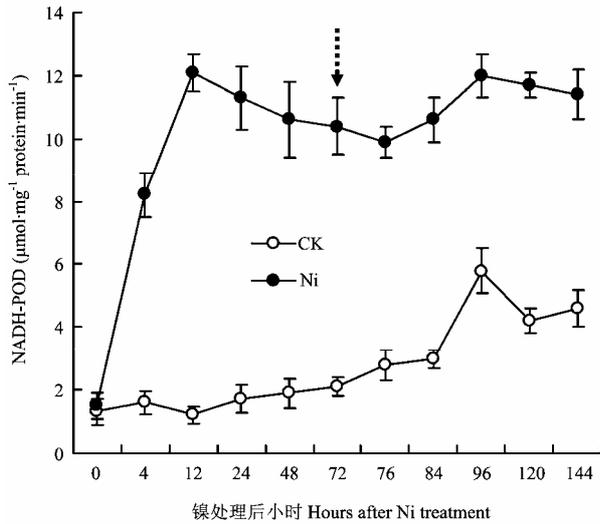


图 3 镍处理和 *Xoo* 接种后幼苗第三叶外质体中 NADH-POD 活性的变化

Fig. 3 Changes in the apoplastic NADH-POD activities of the third leaf of the seedlings after nickel treatment and inoculation with *Xoo*

接种组中, DAO 活性在接种后 4—24 h 间下降, 随之上升, 然后下降; 同 NADH-POD 类似, 镍诱导且接种组的 DAO 活性始终明显地高于未诱导但接种组(图 4)。

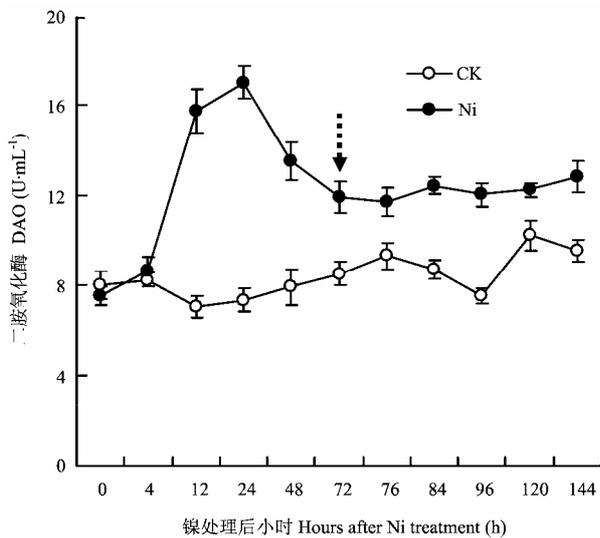


图 4 镍处理和 *Xoo* 接种后幼苗第三叶外质体中 DAO 活性的变化

Fig. 4 Changes in the apoplastic diamine oxidase (DAO) activities of the third leaf of the seedlings after nickel treatment and inoculation with *Xoo*

## 2.4 镍处理和 *Xoo* 接种后 $H_2O_2$ 含量的变化

接种前, 镍引起外质体  $H_2O_2$  含量显著上升, 处理后 0—4 h 和 12—24 h 是 2 个上升较快的时间段, 于 24 h 达最大值, 此时为对照的 2.6 倍; 随后, 尽管  $H_2O_2$  含量有一个明显的下降过程, 但仍显著高于对照。

为弄清外质体  $H_2O_2$  的产生机制以及它在镍诱导的、对白叶枯病的系统抗性中的作用, 用 NADPH 氧化酶的特异性抑制剂 DPI ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和介导  $H_2O_2$  产生的 POD 的特异性抑制剂  $\text{NaN}_3$ <sup>[6]</sup> ( $50 \text{mm}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预处理水稻幼苗, 发现 DPI 处理对镍诱导的  $H_2O_2$  产生无明显影响, 而  $\text{NaN}_3$  导致镍诱导的  $H_2O_2$  产生量明显降低(图 5), 说明 NADPH 氧化酶没有参与镍诱导的外质体  $H_2O_2$  的产生, 而 POD 参与了该过程。另一方面, DPI 预处理对镍诱导的抗白叶枯病作用无明显影响(结果未显示), 而  $\text{NaN}_3$  预处理却削弱了镍的抗病诱导效应(图 6)。

镍诱导 3 d 的幼苗在接种 *Xoo* 后, 在未诱导组中,  $H_2O_2$  含量经历了一个先上升后下降的过程, 峰值出现在接种后 24 h, 随后迅速下降; 镍诱导组的  $H_2O_2$  含量在接种后 0—12 h 无变化, 其后上升至一个相对恒定的水平; 在整个测定的时间范围内始终显著高于未诱导但接种组(图 5)。

## 2.5 镍处理和 *Xoo* 接种后木质素含量的变化

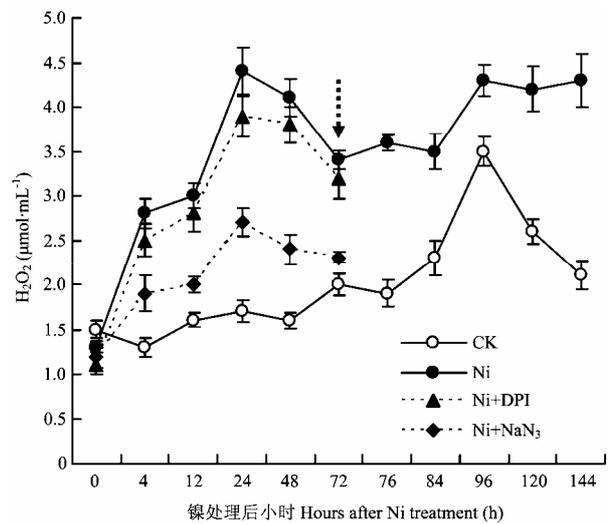


图 5 镍处理和 *Xoo* 接种后幼苗第三叶外质体中  $H_2O_2$  含量的变化

Fig. 5 Changes in the apoplastic  $H_2O_2$  content of the third leaf in the seedlings after nickel treatment and inoculation with *Xoo*



图 6  $\text{NaN}_3$  预处理对镍诱导的抗白叶枯病效应的影响  
Fig. 6 Effects of pretreatment with  $\text{NaN}_3$  on the induced resistance against bacterial blight by nickel

接种前, 镍处理组的木质素含量显著增加, 上升最快的时期是 24—48 h。未经镍诱导的幼苗在接种后 24—48 h 间, 木质素含量也显著增加; 镍诱导组在接种后的木质素含量一直缓慢增加, 且明显高于未诱导但接种组 (图 7)。

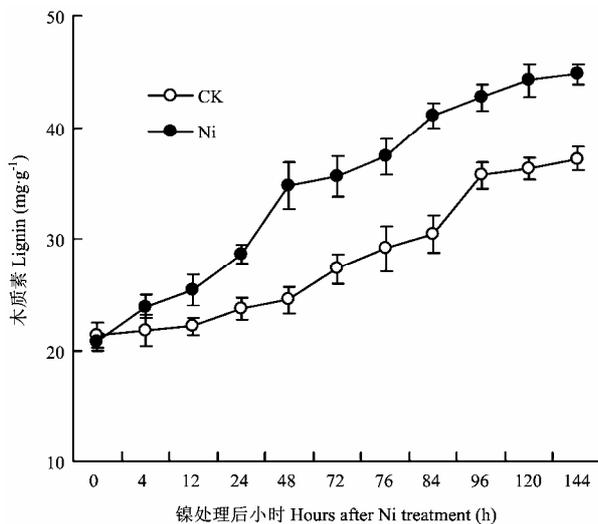


图 7 镍处理和 *Xoo* 接种对幼苗第三叶木质素含量的影响  
Fig. 7 Effects of nickel treatment and inoculation with *Xoo* on the lignin content in the third leaf of seedlings

### 3 讨论

植物外质体构成病原入侵的结构和生理性屏障。研究表明, 外质体 ROS 产生与积累可能是植物对病原、激发子和非生物胁迫的共同反应。Bestwick 等<sup>[18]</sup>发现, 在丁香假单胞菌菜豆致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) 诱发的过敏反应中, 莴苣叶外质体中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的水平提高。在盐胁迫下, 外质体中积累的  $\text{O}_2^-$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱发小叶脉上坏死斑的形成<sup>[24]</sup>。同样, 在锰胁迫下, 豇豆叶中高水平的外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 POD 活性与锰毒症状的发生以及品种的锰抗性密切相关<sup>[11]</sup>。本研究的结果表明:  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  镍处理水稻幼苗第二叶及以下部位, 第三叶外质体中  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量快速且显著上升, 峰值 (24 h) 以后维持在一个相对高的水平; 镍处理 3 d 后接种 *Xoo*,  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量一直高于未处理的对照 (图 5)。许多证据表明,  $\text{H}_2\text{O}_2$  在抗病防卫反应中起多种重要作用。例如, 细胞壁成分的氧化交联加固结构性防线; 调节抗氧化反应和病程相关蛋白基因的表达; 参与植保素的合成; 参与 SAR 的信号传递; 本身也有一定的、直接杀死病原的作用<sup>[4]</sup>。因此可以推测, 外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  参与了镍诱导的水稻白叶枯病系统抗性的建立与维持。用产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 POD 的抑制剂  $\text{NaN}_3$  预处理幼苗, 外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量降低, 镍诱导的白叶枯病系统抗性被削弱 (图 6), 进一步支持了上述观点。本研究中,  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  镍喷施 12 d 后, 发现植株的鲜重与对照比下降了 12.7% (结果未显示), 说明植株处于轻微的镍胁迫状态。在这种情况下, 镍诱导产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  主要起有益的作用。

关于外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生有几种酶促机制。研究最清楚的是质膜上的 NADPH 氧化酶。该酶类似于哺乳动物吞噬细胞中参与呼吸突发的 NADPH 氧化酶<sup>[4]</sup>。用该酶的特异性抑制剂 DPI<sup>[6]</sup> 预处理水稻植株, 发现外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  的水平无明显下降 (图 5), 提示该酶没有参与镍处理下外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  的诱导产生过程。第二种酶促机制是 POD。已知, 在炭疽病 (*Colletotrichum lindemuthianum*) 细胞壁激发子诱导的菜豆悬浮细胞中, 细胞壁 POD 参与了胞外 ROS 的产生, 而与 NADPH 氧化酶无关<sup>[6]</sup>。其中, NADH-POD 是外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  的重要来源。锰处理下, 豇豆叶片外质体中 NADH-POD 活性提高; 体外试验表明, 该酶活性的刺激伴随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生<sup>[11]</sup>。Diaz-Vivancos 等<sup>[10]</sup>报道, 杏长期感染李痘病毒后, NADH-POD 活性的诱导是外质体  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量上升的部分原因。本研究中, AWF 和细胞壁结合

的 NADH-POD 的活性在镍处理下显著提高, 从时间进程上考虑, 酶活性峰值出现的时间比 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累峰值早 12 h, 提示该酶可能在外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生中扮演重要角色。另外, 本试验还证明, DAO 也参与了镍诱导的外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生过程, 这可以从镍处理下该酶活性随时间的动态变化中反映出来(图 4)。DAO 催化的反应是外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的来源, 并在木质素单体的氧化交联和细胞壁结构的硬化(stiffening)中起作用<sup>[8]</sup>。本试验与 Lin 等<sup>[24]</sup>在水稻的根部得到的结果一致。

木质素是细胞壁上酚类物质的异多聚体, 其单体物质的氧化交联需要 POD 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 参与。在植物 POD 的超家族中, 只有外质体 POD 才能修饰细胞壁结构<sup>[25]</sup>。本研究中, 镍刺激 AWF、细胞壁结合 POD 的活性和外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量上升(图 2、5), 且峰值出现的时间稍早于木质素含量增加最快的时期, 或者与之吻合(图 7), 提示外质体 POD 活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的提高至少可以部分解释木质素积累的事实, 而后者可能与镍诱导的白叶枯病抗性密切相关。在水稻与 Xoo 的非亲和性互作中, 两种阳离子和一种阴离子 POD 同工酶活性增加, 木质素的积累与细菌在叶片中的繁殖、扩散速度下降以及过敏反应的发生有密切的关联<sup>[12]</sup>。苯并噻二唑诱导黄瓜对霜霉病的抗性也与 POD 活性上升和细胞壁木质化有关<sup>[26]</sup>。

值得注意的是, 在镍诱导且接种的组别中, 上述 POD、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、木质素的含量或活性均比未诱导但接种的组别要高(图 2、5 和 7)。这些结果提示, 镍处理水稻第二叶 3 d 后, 在第三叶已经诱导了一些本身针对镍胁迫的抗性机制。然而, 这些反应对病原同样有效, 此时接种 Xoo, 会对细菌的侵入与扩散起到抵御作用。积累的证据表明: 植物对非生物胁迫与病原的防御在信号传递组分和基因表达的诱导上有部分的重叠与交叉, 一部分抗病防卫反应的机制同样可以由非生物胁迫来诱导<sup>[27]</sup>。最近, Sudo 等<sup>[12]</sup>利用 DNA 芯片结合 real-time PCR 技术研究了铜胁迫下水稻基因的表达谱, 发现铜诱导的基因中有部分基因参与植物抗病防卫反应, 其中包括抗病信号传递组分和参与植保素、木质素合成的基因。下一步研究的主题为镍是否诱导了抗病相关基因或/和防卫基因的表达。

## 4 结论

4.1 NADH-POD 和 DAO 活性提高是镍诱导外质体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增加的原因。

4.2 外质体中的一些反应, 包括 POD 活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

水平的快速上升, 以及木质素积累可能参与了镍诱导的水稻对白叶枯病的系统抗性。

## References

- [1] 王海华, 曾富华, 曹赐生, 康健. 硝酸镍对水稻抗白叶枯病的诱导作用. 湖南农业大学学报, 2000, 26(2): 119-121.  
Wang H H, Zeng F H, Cao C S, Kang J. Resistance to bacterial blight induced by nickel nitrate in rice seedlings. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2000, 26(2): 119-121. (in Chinese)
- [2] 宋凤鸣, 葛秀春, 郑重, 谢艳. 苯并噻二唑诱导水稻对白叶枯病的系统获得抗性. 中国水稻科学, 2001, 15(4): 323-326.  
Song F M, Ge X C, Zheng Z, Xie Y. Benzothiadiazole-induced systemic acquired resistance in rice against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, 15(4): 323-326. (in Chinese)
- [3] Dietz K J. Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany*, 1996, 58: 221-254.
- [4] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48: 251-275.
- [5] Park H J, Doke N. Convenient assay of O<sub>2</sub><sup>-</sup> generated on potato tuber tissue slices treated with fungal elicitor by electron spin resonance—no secondary oxidative burst induction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. *Plant Pathology Journal*, 2005, 21: 283-287.
- [6] Bolwell G P, Davies D R, Gerrish C, Auh C K, Murphy T M. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology*, 1998, 116: 1379-1385.
- [7] Grant J J, Yun B W, Loake G J. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: Identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *The Plant Journal*, 2000, 24: 569-582.
- [8] Asthir B, Duffus C M, Smith R C, Spoor W. Diamine oxidase is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the chalazal cells during barley grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 677-682.
- [9] Hirada S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42: 462-468.
- [10] Diaz-Vivancos P, Rubio M, Mesonero V, Periago P M, Ros Barceló A, Martínez-Gómez P, Hernández J A. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: Response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 3813-3824.
- [11] Fecht-Christoffers M M, Führs H, Braun H P, Horst W J. The role of

- hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. *Plant Physiology*, 2006, 140: 1451-1463.
- [12] Reimers P J, Guo A, Leach J E. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology*, 1992, 99: 1044-1050.
- [13] Bindschedler L V, Dewdney J, Blee K A, Stone J M, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies D R, Ausubel F M, Bolwell G P. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 2006, 47: 851-863.
- [14] Sudo E, Itouga M, Yoshida-Hatanaka K, Ono Y, Sakakibara H. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 3465-3474.
- [15] Blinda A, Koch B, Ramanjulu S, Dietz K J. *De novo* synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 1997, 20 (8): 969-981.
- [16] 王海华, 曾富华, 康健, 易克. 镍处理对水稻叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累和抗病的诱导效应. *植物生理学报*, 2001, 27(1): 61-65.
- Wang H H, Zeng F H, Kang J, Yi K. Effect of nickel treatment on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and induced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice leaf. *Acta Phytophysiological Sinica*, 2001, 27(1): 61-65. (in Chinese)
- [17] McRae D G, Thompson J E. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta*, 1983, 158: 185-193.
- [18] Bestwick C S, Brown I R, Mansfield J W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology*, 1998, 118: 1067-1078.
- [19] Naik B L, Goswami R G, Srivastava S K. A rapid and sensitive colorimetric assay of amine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 1981, 111: 146-148.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [21] Gay C, Collins J, Gebicki J M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. *Analytical Biochemistry*, 1999, 273: 149-155.
- [22] Bindschedler L V, Minibayeva F, Gardber S L, Gerrish C, Davies D R, Bolwell G P. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca<sup>2+</sup>. *New Phytologist*, 2001, 151: 185-194.
- [23] Müsel G, Schindler T, Bergfeld R, Ruel K. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*, 1997, 201: 146-159.
- [24] Lin Y C, Kao C H. Nickel toxicity of rice seedlings: The inductive responses of antioxidant enzymes by NiSO<sub>4</sub> in rice roots. *Crop, Environment and Bioinformatics*, 2005, 2: 239-244.
- [25] Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 2004, 9: 534-540.
- [26] 程智慧, 李玉红, 孟焕文, 陈鹏, 杜慧芳. BTH 诱导黄瓜幼苗对霜霉病的抗性与细胞壁 HRGP 和木质素含量的关系. *中国农业科学*, 2006, 39(5): 935-940.
- Cheng Z H, Li Y H, Meng H W, Chen P, Du H F. The relationship between BTH-induced resistance to downy mildew in cucumber seedlings and content of HRGP and lignin in cell wall. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(5): 935-940. (in Chinese)
- [27] Delumeau O, Morère-Le Paven M C, Montrichard F, Laval-Martin D L. Effects of short-term NaCl stress on calmodulin transcript levels and calmodulin-dependent NAD kinase activity in two species of tomato. *Plant, Cell and Environment*, 2000, 23: 329-336.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)