

# BTH 诱导小麦对白粉病的抗性与几丁质酶和 -1,3-葡聚糖酶活性诱导的关系

陈 鹏<sup>a</sup>, 李振歧<sup>b</sup>

(西北农林科技大学 a 生命科学学院; b 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 为了探讨 BTH 对小麦白粉病抗性的诱导以及抗性的部分生理机制, 分别用 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 和 1.6 mmol/L 苯并噻二唑(BTH) 溶液处理小麦幼苗 2 d 后接种白粉病菌, 结果表明, 浓度大于 0.2 mmol/L 的 BTH 处理均能显著诱导小麦幼苗产生对白粉病的抗性; 用 0.4 mmol/L BTH 处理小麦幼苗后间隔不同时间接种白粉病菌, 表明 BTH 诱导小麦产生对白粉病的抗性持久期在 7 d 以上; 对 BTH 处理或接种白粉病菌的幼苗几丁质酶和 -1,3-葡聚糖酶活性的测定结果表明, BTH 处理可系统性地增强这 2 种酶的活性且与小麦对白粉病的诱导抗性密切相关。

**[关键词]** 小麦白粉病; BTH; 诱导抗性; 几丁质酶; -1,3-葡聚糖酶

**[中图分类号]** S432.2<sup>+</sup>6; S435.121.4<sup>+</sup>6

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2007)07-0137-04

## Relationship between induced resistance to *Blumeriagraminisf. sp. tritici* by BTH and activities of chitinase and -1,3-glucanase in wheat

CHEN Peng<sup>a</sup>, LI Zhen-qi<sup>b</sup>

(a College of Life Sciences; b College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract :** Benzothiadiazole (BTH) induced resistance to *Blumeriagraminisf. sp. tritici* in wheat seedlings and physiology mechanism were studied. 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mmol/L BTH were sprayed on wheat seedling 2 days before inoculation with *Blumeriagraminisf. sp. tritici*. Results showed that concentration over 0.2 mmol/L BTH could induce resistance against powdery mildew. Expression of resistance in the leaves could last at least 7 days. Chitinase and -1,3-glucanase activities analysis showed that induced resistance in wheat was accompanied by a systemic increase in both enzymes activities. Two enzymes were related to resistance to powdery mildew in wheat.

**Key words :** wheat powdery mildew ; BTH ; induced resistance ; chitinase ; -1,3-glucanase

小麦白粉病 (*Blumeriagraminisf. sp. tritici*) 是小麦的一种主要病害, 遍及我国各主要麦区, 流行频繁, 损失严重<sup>[1]</sup>。目前, 生产上主要采用选育抗病品种或使用杀菌剂 2 种方法来防治小麦白粉病。虽然国内外已经鉴定的小麦抗病基因有 30 个, 但绝大多数由于抗性丧失及与不良性状紧密连锁, 不能直接在生产上应用, 而应用最广泛的抗性基因 Pm8 抗性

也已丧失 (我国约 90 % 生产用种的抗性基因来自 Pm8 基因), 造成抗病品种缺乏<sup>[2-3]</sup>。而使用杀菌剂不仅使病原物的抗药性不断增强, 并且会导致环境污染、农药残留等问题。因此, 寻找防治小麦白粉病的新方法已成为小麦生产中的重要课题之一。

植物的系统诱导抗性 (SAR) 是近年来研究非常活跃的领域之一, 在实践中亦有不少成功的例子<sup>[4]</sup>。

\* [收稿日期] 2006-05-26

[基金项目] 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目; 杨凌农业生物技术育种中心资助项目

[作者简介] 陈 鹏 (1972 - ), 男, 陕西富平人, 副教授, 博士, 主要从事植物抗性研究。

苯并噻二唑(BTH)是一种人工合成的诱导剂,在国外已被证实能诱导植物产生抗性,而且已经用于少数大田作物的病害防治并取得了较好效果<sup>[4-9]</sup>。国内目前有关BTH诱导小麦产生对白粉病抗性的报道较少<sup>[10]</sup>。而几丁质酶和-1,3-葡聚糖酶是2种细胞壁水解酶,与植物的抗病性关系密切<sup>[11-12]</sup>,为了解BTH诱导小麦对白粉病产生抗性的过程中是否有这两种酶的参与,本研究拟对此进行探讨,以期小麦白粉病控制提供理论依据和有效途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小麦品种为“小偃6号”,由西北农林科技大学农学院提供。将种子播种于塑料营养钵中,每盆播15粒,在(23±2)℃光照培养箱中生长至三叶一心期时待用。白粉菌菌种来自西北农林科技大学植物保护学院实验室,为混合菌种。

### 1.2 BTH对小麦白粉病的诱导抗性测定

1.2.1 不同浓度的BTH处理后小麦白粉病病情指数的测定 分别用0,0.01,0.05,0.1,0.2,0.4,0.8和1.6 mmol/L的BTH溶液,喷洒小麦叶面直至全部湿润(对照喷蒸馏水),2 d后用抖落法接种白粉菌。接种后,保持空气湿度在90%以上(不能向叶面喷水)过夜,之后在23℃条件下常规管理,接种后11 d统计幼苗病情指数。每处理6盆,重复3次。

1.2.2 BTH处理后不同时间接种小麦白粉病病情指数的测定 在接种前1,2,3,4,5,7,11 d及接种后2和4 d,分别用0.4 mmol/L的BTH处理小麦三叶一心幼苗,对照喷蒸馏水,接种后11 d统计幼苗病情指数。每处理6盆,重复3次。

1.2.3 病情指数统计 参照文献[13]的方法进行白粉病病情指数统计。

### 1.3 小麦叶片中几丁质酶和-1,3-葡聚糖酶活性测定

1.3.1 样品采集 取三叶一心期的小麦,用0.4 mmol/L BTH处理幼苗的第一、二叶(对照用蒸馏水处理),分别在处理后不同时间取第三叶测定几丁质酶和-1,3-葡聚糖酶的活性,每处理6盆。另外用0.4 mmol/L BTH处理幼苗2 d后接种白粉菌,对照用蒸馏水处理2 d后接种白粉菌,每处理6盆,分别在接种后不同时间取第三叶测定这2种酶的活性。每处理重复3次。

1.3.2 几丁质酶活性测定 采用文献[14]的方法

分别测定几丁质内切酶和几丁质外切酶的活性,然后计算几丁质酶的总活性。以每小时分解胶态几丁质产生1 μg N-乙酰葡萄糖胺为1个酶活力单位(U),酶活性单位为U/g。底物胶态几丁质由本实验室自制。

1.3.3 -1,3-葡聚糖酶活性测定 参考Joosten等<sup>[15]</sup>的方法测定-1,3-葡聚糖酶活性。以每小时生成1 μg的葡萄糖为1个酶活单位(U),酶活性单位为U/g。

## 2 结果与分析

### 2.1 BTH浓度对小麦白粉病病情指数的影响

图1表明,用不同浓度的BTH溶液处理小麦幼苗,当BTH浓度为0.05~0.10 mmol/L时,幼苗白粉病的病情指数与对照间无显著差异。当BTH浓度为0.2~1.6 mmol/L时,可使幼苗白粉病的病情指数显著降低( $P<0.05$ );但1.6 mmol/L BTH处理使幼苗出现了明显的伤害症状,而0.2~0.4 mmol/L BTH处理的幼苗未有明显损伤。因此,后续研究选用0.4 mmol/L BTH溶液进行处理。

### 2.2 BTH处理后不同时间接种对小麦白粉病病情指数的影响

由图2可知,BTH处理后2~7 d接种白粉菌,小麦白粉病病情指数均显著( $P<0.05$ )低于对照;在BTH处理后11 d接种,虽病情指数仍低于对照,但差异不显著;在接种白粉菌后2和4 d再用BTH处理,病情指数与对照相比无显著差异。上述结果表明,BTH对白粉菌无直接的抑制作用,但可以诱导小麦产生对白粉病的抗性,且抗性的持久期在7 d以上。

### 2.3 BTH对小麦几丁质酶活性的影响

由图3可知,在BTH处理后0.5 d,小麦幼苗第三叶几丁质酶活性与对照接近,在以后的取样时期,BTH处理的几丁质酶活性始终高于对照,且在处理11 d仍保持了较高活性。

图4表明,接种白粉菌后1 d,BTH处理的几丁质酶活性开始逐渐升高,在接种后4 d活性达最高,比对照增加了37%。虽然对照的几丁质酶活性在接种后总体呈上升趋势,至接种后11 d活性最高,但仍低于BTH处理。

### 2.4 BTH处理对小麦-1,3-葡聚糖酶活性的影响

图5表明,BTH处理后0.5和1 d,小麦幼苗第三叶-1,3-葡聚糖酶活性与对照接近;在处理4 d酶活性达到最大(高出对照63%),之后随处理后时

间增加酶活性逐渐下降;在处理后 11 d,处理与对照的酶活性接近。

图 6 表明,接种白粉病菌后,对照的酶活性总体上持续升高,在接种后 11 d 达到最大。BTH 处理

的幼苗第三叶 -1,3-葡聚糖酶活性在整个测定期均高于对照,在接种后 4 d 酶活性达最高,之后随接种后时间增加酶活性逐渐下降,在接种后 7 和 11 d 与对照酶活性接近。

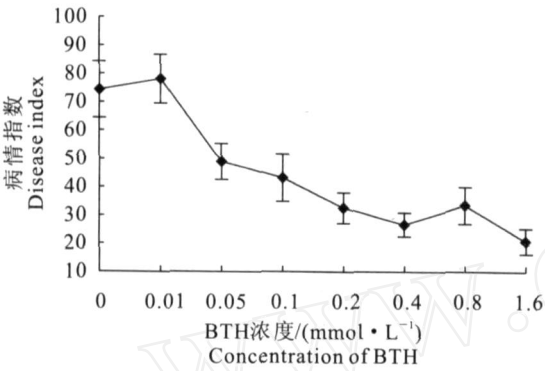


图 1 不同浓度 BTH 处理后小麦幼苗的病情指数  
Fig. 1 Disease index of seedlings after BTH treatment with different concentrations

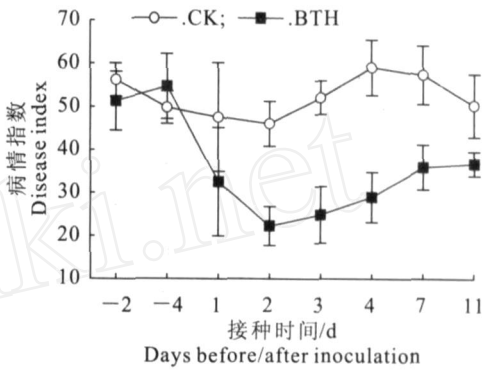


图 2 BTH 处理后间隔不同时间接种小麦幼苗的病情指数  
Fig. 2 Disease index of seedlings after different time interval between BTH treatment and inoculation

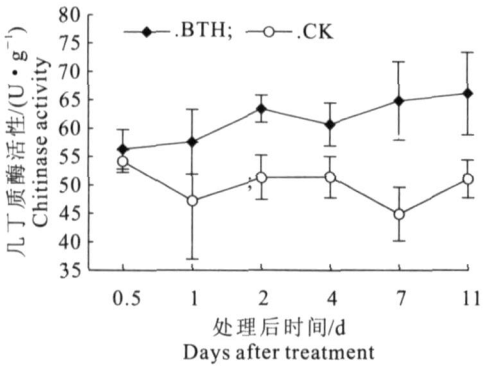


图 3 BTH 处理后接种白粉菌小麦叶片  
几丁质酶活性的变化  
Fig. 3 Change of chitinase activity in non-inoculated leaves treated with BTH

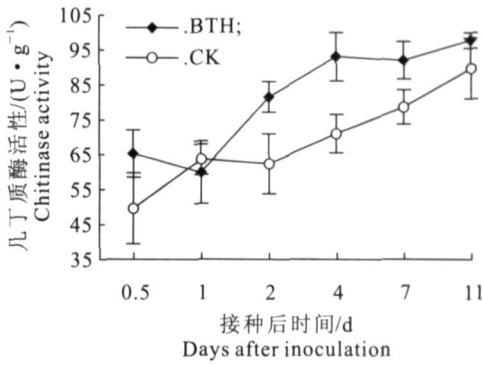


图 4 接种白粉菌后用 BTH 处理小麦叶片  
几丁质酶活性的变化  
Fig. 4 Change of chitinase activity in inoculated leaves treated with BTH

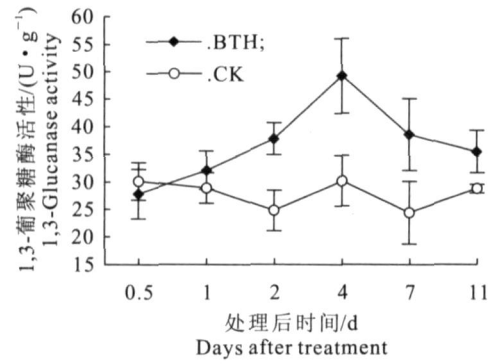


图 5 BTH 处理后接种白粉菌小麦叶片  
β-1,3-葡聚糖酶活性的变化  
Fig. 5 Change of β-1,3-glucanase activity in non-inoculated leaves treated with BTH

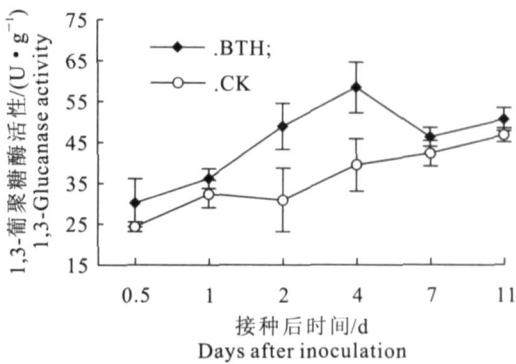


图 6 接种白粉菌后用 BTH 处理小麦叶片  
β-1,3-葡聚糖酶活性的变化  
Fig. 6 Change of β-1,3-glucanase activity in inoculated leaves treated with BTH

### 3 讨 论

本研究结果表明,BTH 对白粉病无直接抑制作用,但可以诱导小麦产生对白粉病的抗性,抗性的持久期在 7 d 以上。本研究为了检测 BTH 诱导小麦对白粉病产生抗性的过程中是否激活了与防卫反应相关的酶的表达,对 BTH 处理或接种白粉菌后小麦叶片的几丁质酶和  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶活性进行了测定,结果表明,BTH 处理可诱导这 2 种酶活性的升高,且在接种白粉菌后,对照的这 2 种酶活性也呈上升趋势,说明其与小麦对白粉病的抗性有关。几丁质和  $\alpha$ -1,3-葡聚糖是真菌细胞壁的重要结构成分,在许多真菌的菌丝顶端, $\alpha$ -1,3-葡聚糖和几丁质暴露在细胞壁表面,能够直接受到  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶的水解<sup>[11-12]</sup>,这不仅使真菌菌丝生长点受到破坏,而且在水解过程中由真菌细胞壁释放出来的寡糖能够作为植物多种抗病反应的激发因子,诱导植物的全面防卫反应<sup>[11]</sup>。本研究用 BTH 处理的小麦叶片,其几丁质酶及  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶活性均高于对照,接种后对照的小麦叶片几丁质酶及  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶活性迅速增加,但比 BTH 处理的小麦叶片酶活性增加的幅度小,说明 BTH 处理能提前诱导小麦体内与防卫反应有关的几丁质酶及  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶的合成,使其在小麦对白粉病的抗性中发挥一定作用。

关于几丁质酶的研究,在双子叶植物如烟草、黄瓜、番茄等作物上报道最多,在单子叶植物特别是小麦上的研究极少,主要是因为小麦的几丁质酶活性本底值低,因此对底物胶态几丁质的要求极高,而传统的制备方法是将几丁质溶解在浓盐酸中,然后进行分散。由于几丁质在酸中的溶解性较差,即使在浓盐酸中过夜仍有大量的不溶物,而溶解部分往往是已脱去乙酰基的壳聚糖,以这样的工艺制备的胶态几丁质不仅悬浮状态差,而且乙酰基的大量脱去使酶的作用位点减少,造成几丁质酶活性低,材料无法测定出活性。本试验采用新方法制备胶态几丁质,使几丁质粉在 4℃ 下的浓酸中快速完全溶解。制备 500 mL 3 mg/mL 的胶态几丁质,静置 24 h,析出的上清体积不超过 30 mL,且胶态几丁质颗粒均匀,完全可以满足小麦几丁质酶活性测定的要求。目前该方法正在申请专利。

致谢:在试验阶段,西北农林科技大学植物保护学院康

振生教授提供了 BTH,在此深表感谢!

### 【参考文献】

- [1] 喻大昭,杨立军,杨小军,等. 对小麦白粉病菌有活性的植物源粗提物的筛选[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2004,30(2):142-144.
- [2] 解超杰,杨作民,孙其信. 小麦抗白粉病基因[J]. 西北植物学报,2003,23(5):822-829.
- [3] 张海泉,符晓棠,郝晨阳,等. 小麦白粉病抗性基因的研究进展[J]. 沈阳农业大学学报,2003,34(1):68-71.
- [4] Vallad G E, Robert M G. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture[J]. Crop Sci,2004,44:1920-1934.
- [5] Stadnik M J, Buchenauer H. Effects of benzothiadiazole, kinetin and urea on the severity of powdery mildew and yield of winter wheat[J]. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,1999,106:476-489.
- [6] Perez L, Rodriguez M E, Rodriguez F, et al. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. tabacina[J]. Crop Prot,2003,22:405-413.
- [7] Abbasi P A, Al-Dahmani J, Sahin F, et al. Effect of compost amendments on disease severity and yield of tomato in conventional and organic production systems[J]. Plant Dis,2002,86:156-161.
- [8] Buonauro R, Scarponi L, Ferrara M, et al. Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease[J]. Eur J Plant Pathol,2002,108:41-49.
- [9] Maxson-Stein K, He S Y, Hammerschmidt R, et al. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes[J]. Plant Dis,2002,86:785-790.
- [10] 黄雪玲,黄丽丽,康振生,等. BTH 对小麦产生白粉病抗性的诱导作用[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(8):78-80.
- [11] Selitrennikoff C P. Antifungal proteins[J]. Apple Environ Microbiol,2001,67:2883-2894.
- [12] Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, et al. Linear  $\alpha$ -1,3-glucanase are elicitors of defense responses in tobacco[J]. Plant Physiol,2000,124:1027-1037.
- [13] 许红,刘华林. 小麦白粉病产量损失及防治指标的初步研究[J]. 植保技术与推广,1997,17(2):3-5.
- [14] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [15] Joosten M H, Dewit P J. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* as  $\alpha$ -1,3-glucanase and chitinase[J]. Plant Physiol,1989,89:945-953.