

不同抗性小麦品种感染蓝矮病植原体后体内防御酶活性的研究

朱玉梅, 张 荣

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】通过研究小麦体内过氧化物酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶活性的变化规律与植原体侵染过程及品种抗病性的关系,从生理生化角度揭示小麦品种抗蓝矮病的机制,为蓝矮病的防治和生产上选育优质小麦抗病品种提供理论依据。【方法】对抗、感小麦品种(烟 D27、小偃 6 号)接种小麦蓝矮病植原体,观察其症状变化,同时采用紫外分光光度计法,定期测定小麦叶片的过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性并进行比较分析。【结果】症状观察发现,感病品种的潜育期为 12 d 左右,抗病品种为 18 d 左右。防御酶活性的测定表明,随着植原体的侵染,抗病品种的 3 种防御酶活性均有不同程度的提高,活性提高幅度较大的时期因酶而异,但早于感病品种;感病品种防御酶活性升高较慢且较抗病品种滞后,有时甚至出现酶活性下降现象。【结论】小麦蓝矮病潜育期长短因品种抗性而异,3 种防御酶活性变化规律不仅与品种抗性有一定的相关性,而且与植株发病程度密切相关,这些防御酶活性出现的峰值高低与早晚,可作为小麦抗蓝矮病早期鉴定的一种有价值的重要生理指标。

【关键词】 小麦蓝矮病植原体;过氧化物酶;多酚氧化酶;苯丙氨酸解氨酶

【中图分类号】 S435.121.4⁺9;S512.1⁺10.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)06-0165-05

Changes in activities of three defendant enzymes in different wheat cultivars infected by wheat blue dwarf phytoplasma

ZHU Yu-mei, ZHANG Rong

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The relation between the changes in activities of three defendant enzymes peroxidase(POD), polyphenol oxidase(PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) in different wheat cultivars infected by wheat blue dwarf phytoplasma(WBD) and resistance to phytoplasmas were studied to investigate its resistant mechanism and provide theoretical basis for controlling the disease and selecting resistant varieties. 【Method】The activities of POD, PPO and PAL in one resistant and one susceptible wheat cultivars infected by WBD were measured using spectrophotometer. 【Result】The results showed that the incubation period of resistant cultivar was 12 days and susceptible 18 days and the enzyme activities of PPO, POD, PAL in resistant cultivar markedly increased with the increase of the time course of infection and the disease expansion, the peak of their activities appeared earlier than in susceptible one. 【Conclusion】These results suggested that early rapid increase of three enzyme activities might be used to serve as one of the valuable physiological indices for the selection of wheat resistant cultivar to WBD.

Key words: wheat blue dwarf phytoplasmas peroxidase(POD); polyphenol oxidase(PPO) phenylala-

* [收稿日期] 2007-12-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771735);陕西省自然科学基金项目(2005C1 23);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(No. 200558);高等学校学科创新引智计划项目(No. B07049)

[作者简介] 朱玉梅(1978-),女,甘肃皋兰人,在读硕士,主要从事植物病害综合防治研究。E-mail: ymzhu1205@yahoo. com. cn

[通讯作者] 张 荣(1964-),女,陕西榆林人,副教授,主要从事植物病毒学研究。E-mail: rongzh@nwsuaf. edu. cn

小麦蓝矮病(Wheat blue dwarf)是由介体条沙叶(*Psammotettix st riatus* L.)专化性传播的小麦植原体(Phytoplasma)病害,目前仅在我国有该病发生的报道^[1-4]。感病小麦轻者不能正常拔节抽穗或抽小穗不实、子粒秕瘦,重者生长停滞、很快枯死,往往全田发病,危害十分严重。该病在20世纪80年代以前主要在干旱、半干旱的中低产晚熟冬麦区间歇性发生危害,但自上世纪90年代,特别是进入本世纪以来,由于耕作制度的发展,该病逐步扩展蔓延到中熟麦区如关中水地等南部高产麦区,并在局部地区造成毁灭性危害,成为当前西北干旱地区中熟麦区间作套种和麦草覆盖高产小麦的主要新病害^[1-4]。但由于该病原目前尚不能人工培养及由条沙叶蝉专化性传播、寄生于植物的韧皮部、在病株体内含量低等原因,给该病的防治和致病机理研究带来极大的困难。近些年来,主要对该病害的介体昆虫传毒特性、品种抗病性鉴定、寄主范围、初侵染源等进行了一些研究,并初步从分子生物学角度确定了病原的分类地位^[3-4]。

寄主植物受到病原物侵染后,寄主体内会发生一系列复杂的生理生化变化,而其中酶的变化是基础,寄主植物体内许多保护性酶系统的活性发生明显变化,有的酶活性增加,有的酶活性减弱,从而影响着植物体内各种生理生化代谢的正常进行,最终对植物和病原物的生长和发育造成不利或有利的影响^[5]。在病害发生发展过程中,酶活性的变化一定程度上反应了寄主与病原的互作关系,其中植物体内一些与酚类代谢系统相关的防御酶,如过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等,除参与酚类物质的代谢外,还参与木质素、植保素等次生抗性物质的形成和积累,因此是人们研究植物抗、感病生理生化机制的重要内容^[5-7]。目前,已有一些关于植物受植原体侵染后体内POD、PPO、PAL活性变化情况的报道,如长春花丛枝病^[8]、泡桐丛枝病^[9]、枣疯病^[10]、斑竹丛枝病^[11]、烟草丛枝病^[12]等病害,但尚未见小麦感染蓝矮病植原体后体内相关酶活性变化的研究报道。

本研究在小麦品种抗病性鉴定的基础上^[1-2],定期测定了抗、感品种感染蓝矮病植原体后,植株体内与抗病性密切相关的过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及苯丙氨酸解氨酶(PAL)3种防御酶活性的变化,从而了解病原侵染对小麦寄主酶活性的影

响,明确对小麦抗病性起主要作用的酶,并通过抗病、健株3种酶活性变化规律的比较,分析防御酶活性变化规律与植原体侵染及品种抗病性的相关性,以为控制该病迅速蔓延提供生理生化方面的理论依据,同时为优质抗病小麦品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 毒源标样 小麦蓝矮病毒源标样由西北农林科技大学植保学院植病研究所提供。

1.1.2 品种 感病品种小偃6号、抗病品种烟D27均由西北农林科技大学农学院小麦育种中心提供。

1.2 方法

1.2.1 接种处理 参照张荣等^[2]的方法。每个品种栽植3盆,每盆4株,同时以不接虫为对照,各设3个重复,置无虫温室中培养。在接种后第3,6,9,12,15,18,21,24,27,30和33d,分别取各品种处理组和对照组相同叶位的8~10片叶,置于自封袋并立即放入冰盒中,于-20℃冰箱中保存备用。同时对各品种症状表现进行观察记录。

1.2.2 酶液提取与活性测定 POD、PPO酶液提取参照朱广廉等^[13]的方法,PAL酶液提取参照张志良^[14]的方法。POD活性测定以愈伤木酚为底物,PPO活性测定以邻苯二酚为底物,PAL活性测定以L-苯丙氨酸为底物。以每克鲜重每分钟OD值变化0.01为1个酶活性单位,用“U/(g·min)”表示酶活力,每个样品重复测定3次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 小麦蓝矮病症状表现

接种蓝矮病植原体后,感病品种小偃6号于接种后12d左右表现出植株矮化、叶片褪绿等初期症状;15d左右心叶褪绿出现缺刻;18d后心叶革质光滑且挺直,基部叶片出现黄绿色相间条纹;24d左右植株严重矮缩,基部叶片增宽、颜色发绿发暗;30d后心叶卷曲变黄呈塔尖状,基部叶片叶尖发黄枯萎,出现萎蔫症状;36d以后整株黄化枯萎,叶片挛拉萎蔫,出现早枯现象。抗病品种烟D27初期症状表现较小偃6号晚约6d左右,在接种后18d左右才出现症状且症状较轻,植株稍有矮化、叶片泛黄;24d左右症状典型化,心叶出现缺刻、叶片革质光

滑;30 d后基部叶片也出现增宽变绿情况;36 d后植株叶片褪绿黄化,整株生长势变弱,此时小偃6号病株已经枯萎接近死亡。

2.2 不同抗性品种 POD 活性的变化

抗感病小麦烟 D27 和小偃 6 号接种蓝矮病植原体前后 POD 活性的变化如图 1 所示。

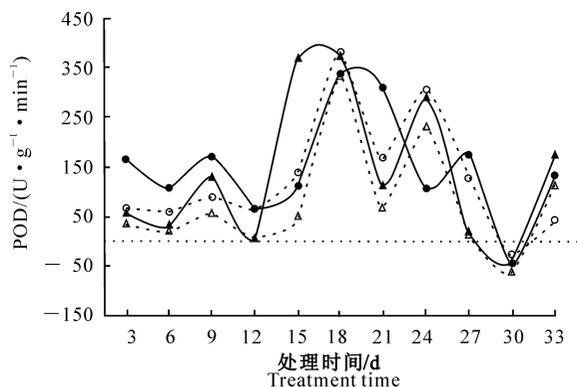


图 1 不同抗性品种接种小麦蓝矮病植原体前后过氧化物酶活性的变化

---○---. 小偃 6 号对照;—●—. 小偃 6 号接种处理;
---△---. 烟 D27 对照;—▲—. 烟 D27 接种处理

Fig. 1 Changes of POD activity of two wheat cultivars before and after WBD infecting

---○---. CK of Xiaoyan 6;—●—. Infected treatment of Xiaoyan 6;
---△---. CK of Yan D27;—▲—. Infected treatment of Yan D27

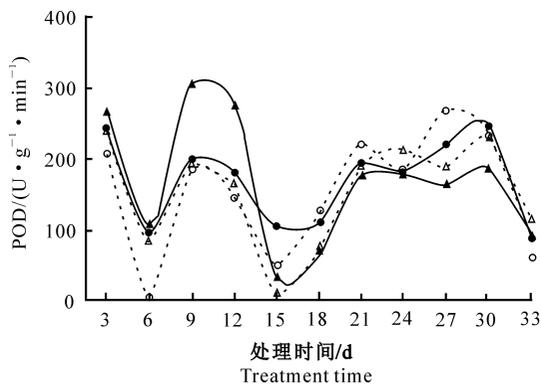


图 2 不同抗性品种接种小麦蓝矮病植原体前后多酚氧化酶活性的变化

---○---. 小偃 6 号对照;—●—. 小偃 6 号接种处理;
---△---. 烟 D27 对照;—▲—. 烟 D27 接种处理

Fig. 2 Changes of PPO activity of two wheat cultivars before and after WBD infecting

---○---. CK of Xiaoyan 6;—●—. Infected treatment of Xiaoyan 6;
---△---. CK of Yan D27;—▲—. Infected treatment of Yan D27

2.4 不同抗性品种 PAL 活性的变化

由图 3 可以看出,接种前感病品种小偃 6 号的 PAL 活性明显高于抗病品种烟 D27,但两品种 PAL 活性的变化趋势基本一致。接种蓝矮病植原体后,

由图 1 可以看出,抗、感病小麦烟 D27 和小偃 6 号未接种小麦蓝矮病植原体的健康植株相比,二者 POD 活性变化趋势一致,且无明显差异。但接种后两者的 POD 活性表现出较大差异,这种差异主要从接种后的第 12 d 开始表现明显,12 d 前感病品种酶活性高于抗病品种,变化趋势与健康植株一致。接种 12 d 后抗病品种烟 D27 的 POD 活性波峰高于对照和感病品种,且向前推进,高峰较对照及感病品种提前 3 d 左右,于第 15,24 天出现 2 次高峰;感病品种小偃 6 号的 POD 活性较对照及抗病品种降低且滞后,大约在接种后的第 19 天才出现第一次高峰,并在接种后第 27 天左右出现第二次高峰。

2.3 不同抗性品种 PPO 活性的变化

由图 2 可以看出,无论接种与否,抗、感品种 PPO 活性的整个变化趋势基本一致,且均表现为接种后的前 18 d 高于对照,18 d 后低于对照。所不同的是抗病品种烟 D27 在接种后第 9 天左右,PPO 活性出现了 1 个明显的高峰,约是对照及感病品种的 1.8 和 1.6 倍。PPO 活性的这一变化特点反映在病程发展的一定阶段,提示 PPO 活性与小麦品种的抗病性有一定关系。

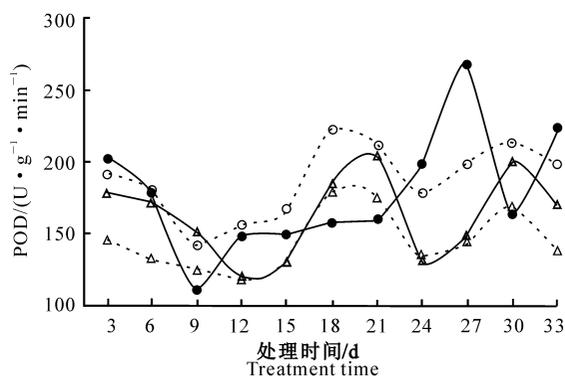


图 3 不同抗性品种接种小麦蓝矮病植原体前后苯丙氨酸解氨酶活性的变化

---○---. 小偃 6 号对照;—●—. 小偃 6 号接种处理;
---△---. 烟 D27 对照;—▲—. 烟 D27 接种处理

Fig. 3 Changes of PAL activity of two wheat cultivars before and after WBD infecting

---○---. CK of Xiaoyan 6;—●—. Infected treatment of Xiaoyan 6;
---△---. CK of Yan D27;—▲—. Infected treatment of yan D27

二者 PAL 活性的变化表现出较大差异,抗病品种烟 D27 的 PAL 活性较对照提高,特别是接种后 0~12 d、18~21 d 和 30 d, PAL 酶活性显著高于健康植株及感病品种,并在第 21 天达到最高峰,但整体变化

趋势与健康植株一致;感病品种小偃 6 号的 PAL 酶活性总体上较对照降低,只有在接种后第 27 天左右出现 1 个明显的高峰,该峰虽滞后于抗病品种但其峰值却显著高于抗病品种。由此可见,品种的抗病性强弱既与接种后 PAL 酶活性的变化及峰值有关,也与酶活性的变化速度密切相关。

3 讨论

植原体侵入小麦体内后,首先寄生到韧皮部筛管然后再向整个植株扩展,最终导致小麦有机体功能紊乱,影响体内细胞的正常代谢,表现出病状。由小麦蓝矮病症状的表现可知,小麦蓝矮病潜育期长短因品种抗性而异,感病品种的潜育期为 12 d 左右,抗病品种为 18 d 左右;感病品种症状出现早而典型、植株过早衰弱而早枯、生长期明显短于健康植株,抗病品种症状表现晚且轻,与感病品种相比生长势良好。抗病品种对植原体的侵染反应敏感,接种后几种防御酶活性均较对照有不同程度的提高,较大幅度提高时期因酶而异,但早于感病品种;感病品种的几种防御酶活性则升高较慢且往往较抗病品种滞后,有时甚至出现酶活性下降的现象。这一结果说明,POD、PPO 和 PAL 3 种防御酶活性的变化规律不仅与品种抗性有关,而且与植株病程有关,这些防御酶活性变化出现的峰值强弱及其早晚,可作为早期鉴定小麦抗蓝矮病的一种重要生理指标。

许多研究^[15-18]认为,植物的抗病机制与 POD、PPO、PAL 这 3 种防御酶的活性变化有关,它们主要通过参与氧自由基的消除反应、木质素合成及催化酚类物质氧化等有效阻止病原物的扩展。POD 是植物体内广泛存在的一类氧化酶,植株内 POD 的变化与其内部的生理代谢变化密切相关,POD 在木质素生物合成的最后一步反应过程中,通过催化 H₂O₂ 的分解而发挥作用;PPO 通过催化木质素及醌类化合物的形成,构成保护性屏蔽而使细胞免受病菌的侵害;PAL 则是苯丙烷类代谢途径中的第一个关键酶,与植保素、木质素及酚类化合物的形成密切相关,在 PAL 的作用下,苯丙氨酸脱氨基可以生成酚类和其他具有抗菌活性的物质。

本试验在不同抗性小麦品种接种小麦蓝矮病植原体后,对 POD、PPO 和 PAL 3 种酶活性的动态分析表明,尽管抗病品种的基础酶活性较感病品种低,但在受到植原体侵染后,其体内的细胞可以作出较快的抗病反应,POD、PPO、PAL 活性较对照明显提高且很快达到高峰,这与已报道的大多数植原体病

害,如泡桐丛枝病^[9]、枣疯病^[10]、斑竹丛枝病^[11] 一致。但从酶活性的波形变化中也可以看到,无论感病品种还是抗病品种,在一定时间段都出现酶活性低于对照的情况,这种现象在胡勤学等^[19]用泡桐丛枝病感染长春花^[8]和丁正民^[20]对桑萎缩病的研究中也出现过,这有可能是植原体与小麦相互作用导致小麦有机体功能紊乱,影响小麦植株细胞正常代谢的结果,但还需做进一步的研究探讨。

本试验仅对 1 个抗病品种和 1 个感病品种进行了测定,要鉴定寄主对病害的抗性及其与一些主要酶之间的关系,应选择多个主要品种进行测定,并对寄主抗性与酶活性之间的关系做进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张 荣,张秦凤.不同品种(品系)对小麦蓝矮病的抗病性[J].植物病理学报,1998,28(2):122.
Zhang R,Zhang Q F. Identification of resistance in wheat varieties (races) to wheat mycoplasma like-organism blue dwarf [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1998, 28(2):122. (in Chinese)
- [2] 张 荣,张秦凤.小麦类菌原体蓝矮病品种抗病性鉴定接种方法研究[J].中国农学通报,1997,13(3):42-44.
Zhang R,Zhang Q F. Studies on the inoculability of resistance identification in wheat varieties (races) to wheat mycoplasma like-organism blue dwarf [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1997, 13(3):42-44. (in Chinese)
- [3] 顾沛雯,吴云锋,安凤秋,等.小麦蓝矮植原体寄主范围的鉴定及 RFLP 分析[J].植物病理学报,2007,37(4):390-397.
Gu P W,Wu Y F,An F Q,et al. Host range testing and RFLP analysis of wheat blue dwarf phytoplasma [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(4):390-397. (in Chinese)
- [4] 张 荣,崔晓艳,孙广宇,等.小麦蓝矮病植原体转运蛋白 SecY 基因片段序列分析[J].植物病理学报,2007,37(4):446-448.
Zhang R,Cui X Y,Sun G Y,et al. SecY gene sequence analysis of phytoplasma associated with wheat blue dwarf [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(4):446-448. (in Chinese)
- [5] 高必达,陈 捷.生理植物病理学[M].北京:科学出版社,2006:156-159.
Gao B D,Chen J. Physiological phytopathology [M]. Beijing: Science Press, 2006:156-159. (in Chinese)
- [6] Balamuralikrishnan M,Doraisamy Sabitha,Ganapathy T,et al. Effects of biotic and abiotic agents on *Sugarcane mosaic virus* titre, oxidative enzymes and phenolics in *Sorghum bicolor* [J]. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 2005, 40(2):9-22.
- [7] Benz A,Spring O. Identification and characterization of an auxin-degrading enzyme in downy mildew infected sunflower [J]. Physiol Mol Plant Path, 1995, 46:163-175.
- [8] 田国忠,金开璇,汪 跃.长春花感染丛枝病原后过氧化物同工

- 酶的变化 [J]. 林业科学研究, 1990, 3(2): 146-150.
- Tian G Z, Jin K X, Wang Y. Changes in peroxidase isoenzymes in periwinkle infected by the paulownia witches' broom agent (MLO) [J]. Forest Research, 1990, 3(2): 146-150. (in Chinese)
- [9] 薛俊杰, 王永琳. 泡桐丛枝病过氧化物酶和多酚氧化酶的研究 [J]. 山西农业科学, 2000, 28(1): 62-64.
- Xue J J, Wang Y L. Study on peroxidase and polyphenol oxidase of paulownia witches broom [J]. Journal of Shaanxi Agriculture Science, 2000, 28(1): 62-64. (in Chinese)
- [10] 张淑红, 高宝嘉, 温秀军. 枣疯病过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的研究 [J]. 植物保护, 2004, 30(5): 59-62.
- Zhang S H, Gao B J, Wen X J. Studies on the changes of peroxidase and phenylalanine ammonia lyase in jujube infected by phytoplasmas [J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2004, 30(5): 59-62. (in Chinese)
- [11] 庄启国, 杨静, 余应建, 等. 斑竹丛枝病过氧化物酶和多酚氧化酶的研究 [J]. 四川农业大学学报, 2005, 23(3): 332-335.
- Zhuang Q G, Yang J, Yu Y J, et al. Study on peroxidase and polyphenol oxidase of bamboo of witches' broom [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2005, 23(3): 332-335. (in Chinese)
- [12] 毛自朝, 杨洋川, 程建勇, 等. 烟草感染丛枝病后生理生化变化的初步研究 I [J]. 云南农业大学学报, 1998, 13(3): 281-285.
- Mao Z C, Yang P C, Cheng J Y, et al. Preliminary studies on biochemical and physiological changes of tobacco infected by witches' broom disease (I) [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 1998, 13(3): 281-285. (in Chinese)
- [13] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验 [M]. 北京大学出版社, 1990: 37-40.
- Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. Experimental Plant Physiology [M]. Beijing: Peking University Press, 1990: 37-40.
- [14] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 154-155.
- Zhang Z L. Experimental Plant Physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 154-155. (in Chinese)
- [15] 曾永三, 王振中. 豇豆与锈菌互作中的多酚氧化酶和过氧化物酶活性及其与抗性的关系 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(2): 145-149.
- Zeng Y S, Wang Z Z. Relationships between activities of polyphenol oxidase and peroxidase, and resistance of cowpea to *Uromyces vignae* [J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2004, 31(2): 145-149. (in Chinese)
- [16] 徐建华, 利容千, 王建波. 黄瓜不同抗病品种感染镰刀菌枯萎病菌后几种酶活性的变化 [J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 239-242.
- Xu J H, Li R Q, Wang J B. Some changes of enzyme activities from susceptible and resistant cucumber cultivars after inoculation with cucumber wilt fusarium [J]. Acta Phytopythologica Sinica, 1995, 25(3): 239-242. (in Chinese)
- [17] 魏相峰, 汤会君. 不同抗性烟草品种感染 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 病菌后几种酶活性测定 [J]. 检验检疫科学, 2006, 16(2): 17-20.
- Wei X F, Tang H J. Bioassay of different tobacco cultivars' the activity of POD, PPO and PAL in interaction with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [J]. Inspection and Quarantine Science, 2006, 16(2): 17-20. (in Chinese)
- [18] Bolwell G P, Wojtaszek D. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence: a broad perspective [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 51: 347-366.
- [19] 胡勤学, 周咏芝, 马修理, 等. 泡桐丛枝病感病指示植物的病理变化 [J]. 中南林学院学报, 1992, 12(1): 57-63.
- Hu Q, Zhou Y Z, Ma X L, et al. The pathological changes of periwinkle infected by paulownia witches' broom of mycoplasma-like organism [J]. Journal of Central South Forestry University, 1992, 12(1): 57-63. (in Chinese)
- [20] 丁正民. 几种植物类菌原体病害与过氧化物酶同工酶关系的研究 [J]. 上海农业学报, 1985, 1(3): 79-82.
- Ding Z M. The study on the relation between some plants associated with MLOs and their Peroxidase Isozyme [J]. Acta Agriculture Shanghai, 1985, 1(3): 79-82. (in Chinese)