

小麦条锈病罹病叶片核酸水解酶活力的变化^{*}

张 慧 商鸿生 李振岐

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 小麦初生叶接种条锈菌后, 亲和反应寄主叶片 RNase 活性, 分别在潜育期和产孢期呈双峰型增长; 不亲和反应叶片 RNase 活性在侵染初期高于健康对照, 但低于亲和性反应, 其后随着病程发展, 近免疫反应叶片 RNase 活性与对照相同, 而中度抗病反应叶片也呈双峰增长, 峰高及峰延续时间不同于亲和性反应。条锈菌侵染对 DNase 活性影响较小, 亲和反应叶片仅在产孢阶段 DNase 活性有所增强, 中度抗病反应叶片在显症时活性增强。

关键词 小麦条锈病; 核糖核酸酶, 脱氧核糖核酸酶, 核酸代谢

中图分类号 S435.121.42

小麦条锈病是我国小麦生产中危害最大的真菌病害, 有关罹病小麦的病理生物化学的基础研究十分薄弱^[1]。前人对小麦秆锈病和叶锈病的研究发现, 锈菌侵染导致寄主核酸代谢发生明显病理变化^[2,3]。条锈病是否有类似现象, 迄今未见诸文献。作者等 1991~1994 年系统研究了小麦条锈病罹病植物的核酸代谢, 本文报道核酸水解酶的变化。

1 材料与方 法

1.1 品种、菌种及接种苗培育

供试小麦(*Triticum aestivum* L.) 为重要栽培品种洛夫林 13 和小偃 6 号。选种后常规方法盆栽土播, 待幼苗第一叶展平(苗龄 9 d)后, 涂抹接种各条锈菌单孢菌系的新鲜夏孢子。供试小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* West.) 为条中 29 号生理小种(Cy29)及其 3 号(CY29-mut 3)、6 号(CY29-mut 6)弱毒突变菌系^[4]。接种苗培养按常规方法进行^[1]。

1.2 核酸水解酶活性的测定

RNase 和 DNase 活性的测定采用外源基质法^[5,6]。新采叶片样在液氮中形成细粉后, 加入乙酸-乙酸钠($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.5)及少量聚乙烯吡咯烷酮(PVP, Sigma 公司产品, 复旦大学欧阳光察先生赠)。提取液离心($27\,000, 4^{\circ}\text{C}$)20 min, 取 $100 \mu\text{L}$ 上清液, 加入 $100 \mu\text{L}$ 酵母 RNA 溶液($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 溶于上述缓冲液, 用前透析除去小分子量核苷及寡聚核苷酸, 用于 RNase 测定)或小牛胸腺 DNA 溶液($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 用前在 100°C 加热 10 min 后迅速冷却至室温, 变性处理, 用于 DNase 测定), 混匀后置于 30°C 水浴中温育 1 h。加入 $800 \mu\text{L}$ 乙醇(95%), 涡旋混合后立即置于 -20°C 冰箱终止反应并沉淀未酶解 RNA 和 DNA, 12 h 后离心($20,000, 4^{\circ}\text{C}$), 上清液稀释 15 倍(对 RNase)或不稀释(对 DNase)后用紫外分光光度计(Unikon-810)在 260 nm 比色。根据与不温育样品间 OD_{260} 差值计算酶活, 每毫克蛋白每小时变化 $1.0 \text{ OD}_{260}(30^{\circ}\text{C})$ 定义为 1 个酶活力单位(u)。样品粗提液中

收稿日期: 1994-05-18

^{*} 高等学校博士点基金资助项目

蛋白质含量的测定按 Bradford^[7]的方法进行。结果以 3 次平行实验 6 次分析的平均值及标准差表示。

2 结 果

2.1 接种品种的病程

洛夫林 13 小麦品种接种 CY29 后,7 d 出现花斑,第 11 d 孢子堆破裂并开始产孢,第 15 d 进入盛产孢期,第 19 d 产孢减少,进入产孢末期,寄主表现为亲和反应(C),反应型为 3-4 型;接种 CY29-mut3 后,第 7 d 显症,随后出现肉眼可辩的小枯斑,不产孢,寄主呈不亲和反应(I),反应型为 0 型。小偃 6 号接种 CY29 后,第 8 d 出现花斑,第 12 d 开始产孢,寄主呈亲和反应(C),反应型为 3 型。接种 CY29-mut6 后,第 7 d 显症,第 11 d 开始少量产孢,并伴随叶组织明显退绿,寄主表现为不亲和反应(I),反应型为 2 型。

2.2 RNase 酶活性的病理变化

未接种小麦初生叶的 RNase 活性随叶龄增加有逐渐升高趋势,但叶龄 19 d(相对于接种后 9 d)前增加并不显著。洛夫林 13 和小偃 6 号在 19 d 仅比叶龄 12 d 增加 4.1%和 8.3%。叶龄 19~21 d 期间,RNase 活性增加较快,两品种增幅分别达到 51.6%和 54.5%,随后小偃 6 号 RNase 活性维持在该水平,而洛夫林 13 在叶龄 29 d 时又有增加(表 1)。

表 1 条锈菌侵染对小麦叶片 RNase 的影响 u · mg⁻¹

品种	样品	接种后天数(d)						
		2	5	7	9	11	15	19
洛夫林 13	CK	1.23±0.03	1.25±0.26	1.24±0.16	1.28±0.13	1.94±0.15	1.97±0.16	2.49±0.15
	I	1.45±0.79	1.42±0.21	1.30±0.12	1.27±0.05	1.76±0.17	2.00±0.15	2.54±0.23
	C	1.98±0.15	2.32±0.17	1.74±0.20	2.69±0.24	4.17±0.33	4.23±0.30	3.25±0.37
小偃 6 号	CK	1.44±0.10	1.43±0.14	1.50±0.16	1.56±0.16	2.41±0.25	2.36±0.20	2.38±0.31
	I	1.87±0.27	1.44±0.09	1.66±0.22	3.22±0.18	2.83±0.30	2.79±0.13	2.64±0.28
	C	1.98±0.08	2.53±0.19	2.03±0.22	2.96±0.31	5.26±0.54	4.70±0.37	4.00±0.25

条锈菌毒性小种 CY29 侵染、寄主呈亲和反应时,叶片 RNase 活性变化十分剧烈,所测 2 个品种的表现基本类似。接种后 2 d,洛夫林 13 和小偃 6 号接种叶 RNase 活性显著高于未接种对照,分别为对照的 1.61 和 1.38 倍。接种后 5 d,RNase 活性进一步增强分别达相应对照的 1.86 和 1.78 倍。显症时(接种后 7 d),RNase 活性有所回落,仅为对照的 1.40 和 1.35 倍。然而,随着产孢临近(接种后 9 d),RNase 再次增加,并达到最高峰,洛夫林 13 和小偃 6 号分别为对照的 2.43 和 2.18 倍。盛产孢后,RNase 活性随病情发展逐渐下降。由此可见,条锈菌侵染时表现亲和反应叶片 RNase 活性呈双峰趋势增长,早期峰在接种后 5 d,晚期峰出现在接种后 9 d,晚期峰峰高大于早期峰。

CY29 弱毒突变菌系侵染过程中,不亲和反应初生叶内 RNase 活性的动态变化趋势因寄主抗病程度不同而大相径庭。呈近免疫反应(洛夫林 13)的叶片在接种初期略高于对照(但远低于同一品种表现亲和反应者),显症后与对照无显著差别,仅呈单峰增长趋势,峰高也极其有限。而呈中度抗病反应的寄主(小偃 6 号)。接种后 2 d 高于对照(但低于亲和性反应);接种后 5 d,与对照无显著性差异,但此后酶活性急剧增加,至接种后 9 d 达到高峰,为对照的 2.06 倍,产孢期间又迅速回落。因而中度抗病反应叶片内 RNase 也呈双

峰增加趋势,与亲和性反应不同之处在于早期峰幅度更低,晚期峰历程短。

2.3 DNase 活性的病理变化

小麦初生叶内 DNase 活性极低,而且在叶片衰老过程中 DNase 比活性变化幅度小,仅在实验末期(叶龄 29 d)时才测得酶活显著增加。条锈菌侵染过程中,呈亲和反应寄主叶片 DNase 活性,仅在产孢后(接种后 11 d)逐渐增加,产孢前与对照不存在显著差别;至于呈不亲和反应的叶片,表现近免疫反应叶片与对照变化趋势相同,而表现中度抗病反应叶片在显症后有所增加,初产孢时达到最高值,与亲和性反应峰值在孢末期有所区别。

表 2 条锈菌侵染对小麦叶片 DNase 活性的影响

$10^{-3} \text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$

品种	样品	接种后天数(d)						
		2	5	7	9	11	15	19
洛夫林 13	CK	82±10	88±8.1	93±13	99±14	88±21	107±8.0	133±14
	I	79±14	94±5.3	94±10	100±12	103±5.0	106±5.4	136±64
	C	86±11	96±7.2	93±21	95±7.5	112±12	170±6.4	214±15
小偃 6 号	CK	100±13	95±8.2	107±16	99±12	87±19	117±14	154±27
	I	102±13	96±17	101±3.1	136±16	434±31	342±19	145±42
	C	96±7.2	101±14.7	94±13	99±17	106±12	259±22	286±15

3 讨 论

Rohringer 等最早发现叶锈菌侵染可导致小麦叶片核糖核酸酶活性增强^[8],对小麦秆锈病的研究亦有类似报道,对条锈病国内外无类似研究。作者等的系统测定表明,小麦受到条锈菌侵染后核糖核酸酶活性有显著增强,因而可以断定核糖核酸酶的这种病理变化是小麦锈病罹病植物核酸代谢的一个普遍特征。

前人关于寄主-病原菌间亲和性及与不亲和性组合核糖核酸酶活性变化因试材不同而不一。Rohringer 等^[8]指出,叶锈菌侵染后小麦感病和抗病品种均在接种后 3 d 和 6 d 酶活性呈双峰增长。Sachse 等^[9]则报道秆锈菌侵染时感病品种呈双峰增长,但抗病品种呈单峰增长。本研究用同一小麦品种分别接种条锈菌同一小种野生菌株或突变菌株而构成亲和性组合和不亲和性组合,进而证实亲和性反应(感病)时核糖核酸酶呈双峰增长;而呈不亲和反应时,则依不亲和程度不同而出现单峰或双峰增长。这表明,核糖核酸酶活性的病理变化不仅与病原菌的侵染活动有关,而且与寄主抗病性也有必然的联系。

植物核糖核酸酶是 RNA 代谢关键酶,自然衰老和环境胁迫都可导致酶活性逐渐增强。锈菌侵染后酶活性变化模式则明显不同,这表明寄主与病原菌相互作用改变了寄主的核酸代谢。但是,酶活性的激增出现在产孢期,正值病原菌生殖活动最旺盛和生物量最大的阶段,病原菌本身对酶活变化的相对“贡献”不可忽略。近来 Barna 等人^[10]发现小麦秆锈病病株胞间 RNase 可能是秆锈菌致病相关因子之一,为此提供了另一旁证。

环境胁迫下 RNase 活性可作为伤害指标。在本研究中,条锈菌侵染早期(接种后 2 d)亲和与不亲和反应酶活即有显著差异,而且中度抗病寄主又较近免疫寄主变幅大。鉴于该阶段病原菌菌体生长量甚微,此种差异究竟是寄主对条锈菌侵染的“伤害反应”抑或主动保卫反应的结果还是有待深入研究。尽管如此,RNase 活性仍不失为侵染早期鉴别寄主抗病性的生化指标。

参 考 文 献

- 1 李振岐,商鸿生. 小麦锈病及其防治. 上海:上海科学技术出版社,1989
- 2 Heitefuss R, Wlof G. Nucleic acids in host-parasite interactions. In: Heitefuss R, Williams PH. (eds). *Physiological Plant Pathology*. Berlin: Springer-Verlag, 1976. 480~508
- 3 Chakravorty AK, Scott KJ. *The Rust Fung*. London: Academic Press, 1982. 179~205
- 4 井金学,商鸿生,李振岐. 小麦重要抗源和后备品种对条锈菌突变菌株的抗性研究. *西北农业大学学报*, 1992, 20 (1): 7~11
- 5 Ambellan E, Hollander VP. A simplified assay for RNase activity in crude tissue extracts. *Anal. Biochem*, 1976, 17: 474~484
- 6 Gaumyartner B, Hans Kende, Matile P. Ribonuclease in Senescing morning glory. *Plant Physiol*, 1975, 55: 734~737
- 7 Bradford MM. a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72: 248~254
- 8 Rohringer R, Samborski DJ, Person CO. RNase-activity in rusted wheat leaves. *Can. J. Bot*, 1961, 39: 77~84
- 9 Sachse B, Wolf G, Fuchs WH. Nukleinsäure abbauende Enzyme in Blättern von *Triticum aestivum* nach Infektion mit *Puccinia graminis tritici*. *Acta Phytopathol. Acad Sci Hung*, 1971, 6: 39~49
- 10 Barna B, Ibenhal WD, Heitefuss R. Extracellular RNase activity in healthy and rust infected wheat leaves. *Physiol Mol Plant Physiol*, 1989, 35: 151~160

Activity of RNase and DNase in Healthy and Stripe-rust Infected Wheat Leaves

Zhang Hui Shang Hongsheng Li Zhenqi

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shannxi, 712100)

Abstract Nucleic acid metabolism of wheat stripe rust infected plants was systematically studied in 1991—1994, which showed that the increase of RNase activity in compatible primary leaves of wheat (*Triticum aestivum*) during the infection process of stripe rust (*Puccinia striiformis* West) followed a twin-peak model with the one in the latent period and another in the sporulation period. In infected incompatible host leaves the RNase activity was higher than that in healthy leaves and lower than that in infected compatible host leaves in the early stage of infection process afterward which decreased to the same level of the healthy leaves in near-immune host while the RNase activity in moderate resistant host leaves increased in the form of twin peaks with different peak height and lasting time from that in the compatible. In addition, it was found that the effect of stripe rust infection was weaker on DNase than on RNase activity. Compatible only in sporulation period and moderate resistant host leaves in symptom-appearance period showed increase in DNase activity respectively.

Key words wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* West), RNase, DNase, Nucleic acid metabolism