

# 大豆锈病与过氧化物酶同工酶关系的初步研究<sup>\*</sup>

费甫华 谈宇俊<sup>1</sup> 周茂繁<sup>2</sup>

(湖北省宜昌市农业科学研究所 宜昌 443004)

## 摘 要

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,研究了大豆锈病不同严重程度、离病斑中心不同距离,以及抗感锈病不同品种接种后病程与过氧化物酶同工酶的关系,结果表明:发病不同严重程度(I~III级)比对照(未接种0级)酶谱带多1~2条,活性由大到小依次为II级>I级>III级>0级;离病斑中心越近酶带越多,且酶活性越强;随着接种时间的推迟(0~32小时)过氧化物酶带数增多,酶活性增强;抗病品种与感病品种接种后相同时间进行比较,抗病品种比感病品种多1~4条酶带,且其酶活性亦较高;Rf值0.78~0.85间的酶谱与大豆锈病的发生发展有着密切关系。

**关键词** 大豆锈病;过氧化物酶;同工酶

大豆锈病属专性寄生病害,是影响大豆稳产、高产的重要因子,该病在东南亚各国广泛流行,危害严重,已蔓延到大洋洲、非洲、拉丁美洲的39个国家和地区<sup>[1,9,12]</sup>。目前大豆锈病在我国南方各省普遍发生且较为严重,有从南向北发展蔓延的趋势,截止1993年底我国已有23个省份有分布,发病后产量一般损失10%~30%,严重时可达50%以上,早期发病甚至造成绝收<sup>[2,3,8]</sup>,因此大力加强大豆锈病的研究与防治已成为当务之急。由于同工酶是基因表达的产物,其电泳图谱反映了病理过程中基因的表达,因而近年来同工酶测定分析技术在抗病遗传育种、抗病机理、物种分类、预测杂种优势等诸方面的研究中被广泛采用。过氧化物酶具有多种同工酶,前人大量研究认为植物病害与过氧化物酶有关<sup>[4,5,6,10,11]</sup>。本文在以前研究的基础上,对大豆锈病严重程度、离病斑中心不同距离,以及抗感锈病不同品种接种后病程与过氧化物酶的关系进行了探讨,目的在于探索大豆抗感锈病机理,为抗锈病育种提供理论依据及生化指标。

<sup>\*</sup> 在农业部科技司领导下,中国农业科学院油料作物研究所与亚洲蔬菜研究发展中心亚洲区域中心(ARC/AVRDC)合作项目子课题

本文于1996年4月24日收到。This paper was received on April 24, 1996.

1. 中国农业科学院油料作物研究所 武汉 430062, 2. 华中农业大学植物保护系 武汉 430070

致谢: 本文承蒙中国农业科学院油料作物研究所余子林研究员审阅,在研究过程中沈明珍同志给予了大力协助,在此深表谢意。

## 材料与方法

### 1. 供试材料

选用具有代表性的锈病感病品种猴子毛及抗病品种 PI459025 菌种为大豆锈病致病菌—*Phakopsora pachyrhizi* Syd的新鲜夏孢子。以上均由中国农科院油料所提供

### 2 试验设计及方法

1)播种 接种及取样方法: 1993年 2月 15日播种于中国农科院油料所玻璃棚内的塑料盒内, 4月 10日将其大豆锈菌连同塑料盆移至温室 ( $22^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$ ), 4月 12日将大豆锈菌新鲜夏孢子从繁殖品种上轻轻敲下, 配制成浓度为 0.1% 的夏孢子悬浮液(每 10ml加 1滴 Towne 80), 用喉头喷雾器均匀地喷在上述品种上, 对照喷清水, 接种后在 0 8 16 24 32小时以及接种后的第 14天取不同严重度和离病斑中心不同距离的样品(取样标准分别见下和见后)各 3g, 并立即存于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用

严重度分级标准:

0级: 健康对照(未接种)

I 级: 孢子堆少而分散, 叶色正常

II 级: 孢子堆较多, 叶面有黄斑

III级: 孢子堆密布, 叶色变黄

2)过氧化物酶同工酶谱及酶活测定方法: 酶谱测定采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 浓缩胶及分离胶的浓度分别为 3%, 7%, 用溴酚兰作前沿指示剂, 电泳时间 5~ 6小时。Rf(迁移率)值计算公式采用

$$\text{Rf值} = \frac{\text{酶带中心与原点的距离}}{\text{溴酚兰指示带与原点的距离}}$$

酶活性测定参照杨家书, 薛应龙 (1984)<sup>[5]</sup>的方法, 酶活性以每分钟光密度的增加值来表示, 即  $\Delta \text{OD}_{470\text{nm}}^{\text{1cm}} \text{min}^{-1}$  (相对活性)

## 结果与分析

### 1. 大豆锈病严重度与过氧化物酶的关系 (图 1)

从图 1可看出: (1)同未接种对照(0级)相比, 大豆感染锈菌后不同严重度(I、II、III级)过氧化物酶带数至少增加 1~ 2条(Rf值为 0.34, 0.91)且活性比对照增强(酶带颜色深, 表明其活性强); (2)不同严重度之间以酶带数多寡及酶活性强弱为标准排列, 依次为 II 级 > I 级 > III级 > 0级, 表明大豆锈病在发病 0~ II 级水平时, 其发病程度与过氧化物酶谱带数及酶活性呈正相关, 在严重度达到最高水平 III级时, 因叶片枯黄而其酶谱带数减少, 酶活性降低

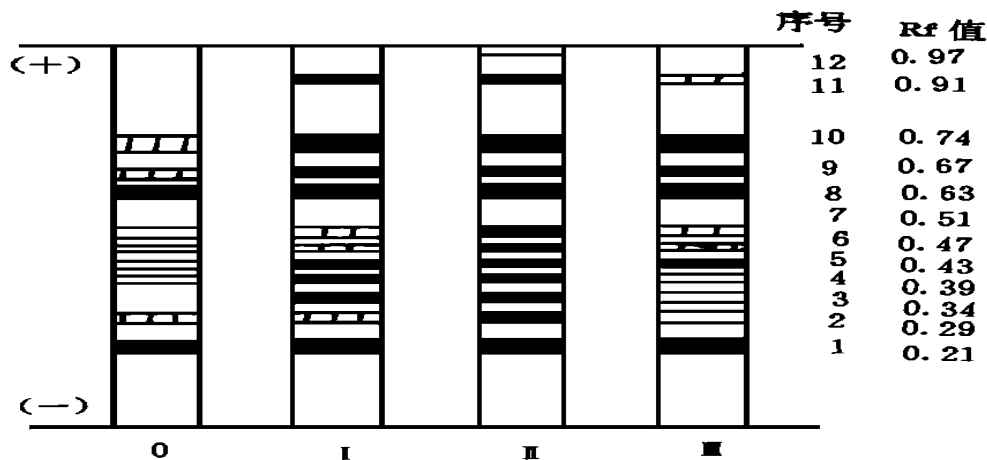


图 1 大豆锈病不同严重度病叶的过氧化物酶同工酶谱模式图

Fig. 1 Isoenzyme pattern of rust infection in different disease leaves

2 大豆锈病斑不同距离与过氧化物酶的关系 (图 2)

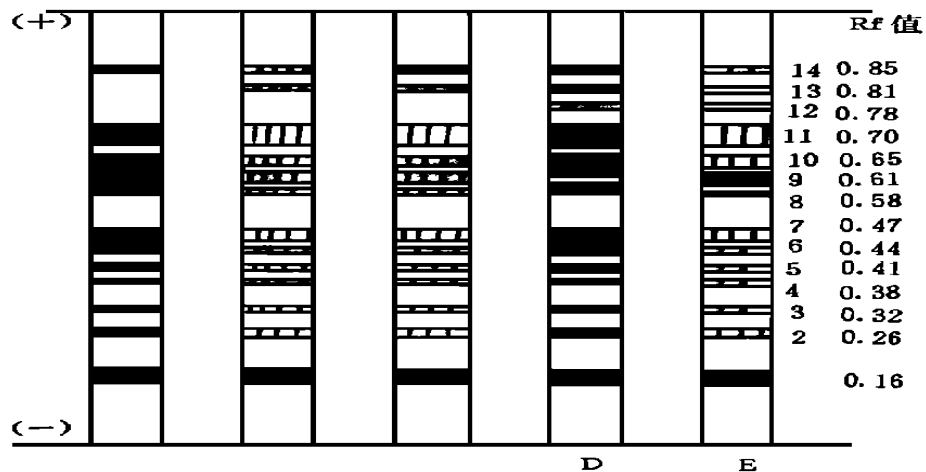


图 2 距离大豆锈病病斑不同位置过氧化物酶谱模式图

A (健叶 CK1) E (病叶 CK2) B 距离病斑中心 0.6cm 以上 C 0.3- 0.6cm D 0.0- 0.3cm

Fig. 2 Distance a part from rust infection spots and isoenzyme pattern

从图 2 可看出: (1)发病叶 E (CK2) 及病叶不同部位 (B C D) 过氧化物酶同工酶带比健叶 A (CK1) 多 1- 2 条酶带 (Rf 值为 0.78, 0.81); (2) 病斑不同部位 (B. C D) 的过氧化物酶谱表明, 越靠近病斑, 其过氧化物酶酶带颜色愈深, 即  $B < C < D$ , 并伴随酶带数的增加; (3) 病叶 E (CK2 混合样) 的酶谱并不是病斑不同位置 B C D 处酶谱的简单叠加; (4) 我们认为过氧化物酶的测定选取病斑及其周围的叶组织效果较好, (5) Rf 值 0.78~ 0.85 间的酶谱与大豆锈病的发生发展有着密切的关系。

## 3. 大豆抗感品种接种后病程与过氧化物酶同工酶谱及酶活性的关系 (图 3)

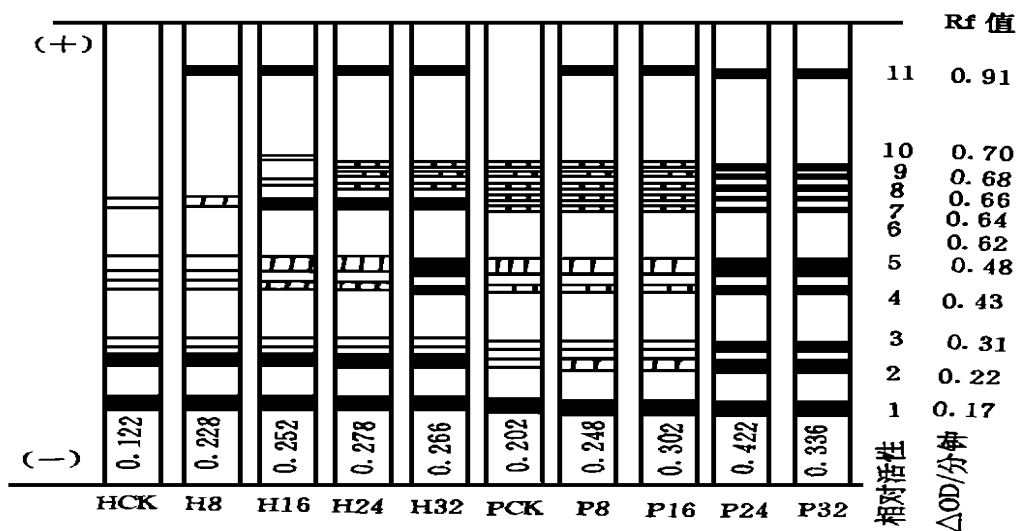


图 3 感病品种猴子毛 (H)与抗病品种 PI459025(P)接种大豆锈菌后过氧化物酶谱及酶活动态变化 (接种时间 8- 32小时)

Fig. 3 Isoenzyme patterns between susceptible and resistant soybean varieties under rust inoculation

从图 3 可看出: (1)抗病品种 PI459025 和感病品种“猴子毛”未接种对照 (PCK 与 HCK) 相比,其过氧化物酶同工酶谱和酶活性存在较大差异,抗病品种 PI459025 的酶带和相对酶活性分别为 10 条,  $\Delta 0.202/\text{min}$ , 而感病品种“猴子毛”分别为 6 条  $\Delta 0.122/\text{min}$ ; (2)两个品种接种后分别比对照增加一条新酶带 (0.91), 且  $Rf 0.43 \sim 0.70$  酶带活性随着时间的延长,有不断增强的趋势,到 32 小时稳中有降; (3)比较两个品种接种后相同时间的酶谱及酶活性,可清楚地看出,抗病品种 PI459025 的过氧化物酶带数较多,其酶活性较强,这与用光度法测定各时间过氧化物酶活性结果基本吻合 (图中所示酶活性相对值为三次测定平均值)

## 小结与讨论

大豆锈病属专性寄生病害,当大豆叶片被感染锈菌后体内发生一系列生化反应,可迅速诱导产生新的过氧化物酶同工酶,且随着接种或被侵染时间的延长,表现出酶带数逐渐增多或酶活性逐渐增强,然而当大豆锈病发生相当严重时,由于寄主正常代谢受到严重破坏,过氧化物酶的谱带数或酶活性并非最多或最强

大豆锈菌感染大豆叶片后,引起过氧化物酶同工酶的变化,这种变化起初在侵染点及其附近,然后向远离侵染点或病斑中心扩展,因而表现出病叶不同位置过氧化物酶同工酶有所不同,且距离病斑中心越近,酶带越多或酶活性越强。

大豆抗感锈病不同品种接种大豆锈菌后,其过氧化物酶同工酶变化存在明显差异,在接种后相同时间进行比较,抗病品种比感病品种多 1~4 条酶带,且其酶活性亦较高,这与费甫华等 (1994)<sup>[7]</sup> 研究结果相吻合。

本研究表明大豆锈病菌的侵染与过氧化物酶同工酶有着密切关系,这与大多数研究者在其它作物病害研究方面的结果基本一致<sup>[4 5 6 11]</sup>,其机理及分子生物学基础方面的工作还需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 庄剑云, 1991, 中国大豆锈病的病原、寄主及分布,《中国油料》(3): 67~ 69
- [2] 谈宇俊、孙永亮, 1989, 大豆锈病菌生理小种的初步研究,《大豆科学》8(1): 71~ 74
- [3] 谈宇俊、孙永亮, 1989, 大豆锈病的鉴定技术,《中国油料》, (1) 65~ 67
- [4] 沈其益等, 1978, 棉花感染枯萎病后过氧化物酶同工酶的变化,《植物学报》20(2): 108~ 113
- [5] 杨家书、薛应龙等, 1984, 小麦品种对白粉病抗病性与过氧化物酶的关系,《植物病理学报》, 14(4): 235~ 239
- [6] 何祖华、石春海等, 1989, 抗感稻瘟病品种的过氧化物酶同工酶分析,《中国水稻科学》, 3(2): 95~ 96
- [7] 费甫华、周茂繁、谈宇俊, 1994, 大豆抗感锈病的不同品种过氧化物酶同工酶比较的初步研究, 大豆锈病研究进展, 武汉: 湖北科学技术出版社, 149~ 158
- [8] 费甫华、周茂繁、谈宇俊, 1995, 中国大豆锈菌冬孢子的形成条件,《华中农业大学学报》, 14(5): 444~ 448
- [9] Tan Yujun. 1994, Epidemiology of soybean rust in china. 大豆锈病研究进展, 武汉: 湖北科学技术出版社, 50~ 59
- [10] Staveley, J. R. and E. W. Hanson, 1967, Electrophoretic comparison of resistant and susceptible *Tyifolium paratense* noninoculated and inoculated with *Erysiphe Polygoni*. *Phytopathology*. 57: 482~ 485
- [11] Veech J. Y. 1969, Localization of peroxidase in infected tobacco susceptible and resistant to black shank. *Phyto pathology*. 59 566~ 577
- [12] Yang, C. Y. 1994, Soybean rust caused by *phakopsora pachyrhizi*. 大豆锈病研究进展, 湖北科学技术出版社, 1~ 22

## PRELIMINARY STUDY ON THE CORRELATION BETWEEN SOYBEAN RUST INFECTION AND PEROXIDASE ISOENZYMES

Fei Fuhua<sup>1</sup> Tan Yujun<sup>2</sup> Zhou Maofan<sup>3</sup>

(1 *Yichang Municipality Agricultural Science Research Institute, Yichang 443004*

2 *Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062*

3 *Department of plant protection, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070*)

### Abstract

Using vertical gel electrophoresis, we studied the correlation between peroxidase isoenzyme and soybean rust of different severity and different distance apart from disease spot's center and different time after inoculation in resistant and susceptible varieties. The results showed that there was one or two more isoenzyme pattern bands in different infection severity (from I to III grade) than CK treatment (Uninoculated, 0 grade). Peroxidase activity from high to low was II grade > I grade > III grade > 0 grade. The closer distance apart from disease spot's center and the period after inoculation in resistant and susceptible varieties the more stronger activity and the more enzyme pattern bands. Comparing resistant and susceptible varieties at the same time after inoculation, the resistant one had 1 to 4 more enzyme pattern bands and stronger enzyme activity than susceptible one. Besides there was close correlation between RF value (0.78 to 0.85) and development of soybean rust.

**Key words** Soybean rust; Peroxidase; Isoenzymes