

# 大豆感染灰斑病菌后自由基含量的变化<sup>\*</sup>

张丽娟<sup>\*\*</sup> 杨庆凯 孙金兰

(东北农业大学大豆研究所 哈尔滨, 150030)

**摘要** 本文采用电子自旋共振 (Electron spin resonance, ESR) 技术直接测定了不同抗性的大豆感染灰斑病菌后叶片中自由基含量的变化。结果表明,大豆品种和病原菌生理小种的组合不同,大豆叶片中自由基含量的变化不同。抗病品种接种后叶片中自由基含量增加,且一直高于相应对照的自由基含量;而感病品种则低于相应对照的自由基含量。本研究认为抗病品种叶片中增加的自由基在抗病反应中起着重要作用。

**关键词** 大豆;灰斑病菌;电子自旋共振;自由基

自由基是游离存在的带有不成对电子的分子、原子或离子。它们的化学性质很活泼,可与生物体内的许多物质发生反应<sup>[1]</sup>。在植物抗逆性方面,关于自由基的研究已有一些报道,如环境污染对植物中自由基代谢的影响等方面。不过,目前多采用间接方法来研究胁迫条件下植物体内自由基变化与植物伤害之间的关系,即采用测定 SOD 等酶活性的方法,或者采用测定脂质过氧化产物的方法。这种间接方法不能测定出生物体内的自由基的含量变化。

大豆灰斑病是一种危害大豆生产的主要病害之一,但关于在大豆和灰斑病菌互作中,大豆体内自由基的研究还十分缺乏。因此,直接测定接种后大豆体内自由基含量的变化对揭示大豆与灰斑病菌相互作用机制具有重要意义。为此,本研究用电子自旋共振 (Electron spin resonance, ESR) 波谱仪直接测定了大豆感染灰斑病菌后不同时期叶片中的自由基含量,将对接种灰斑病菌后不同抗性的大豆叶片中自由基含量的动态变化规律及抗感品种之间的自由基含量变化规律的差异进行分析研究,并以此揭示大豆叶片中自由基在大豆与灰斑病菌互作中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试品种 大豆 (*Glycine max.*) 抗灰斑病品种: 东农 9674 和农大 13699; 感灰斑病品种: 东农 1330 东农 Z44 和黑农 39

\* 国家自然科学基金资助项目

\*\* 第一作者现工作单位为河北农业大学农学院,保定,071001

收稿日期 1998-10-22 Received Oct. 22, 1998

1.1.2 供试菌种 大豆灰斑病菌 (*Cercospora sojina* Hara) 17号生理小种。

## 1.2 方法

1.2.1 供试材料的种植、菌种的培养、接种<sup>[2]</sup>。

1.2.2 样品处理方法 在接种后第1天、第3天、第5天、第7天和第10天分别取供试大豆的叶片(病叶内部含有病原菌菌丝)和相应对照的大豆叶片0.50g于干净的铝盒中,在65℃下烘至恒重;然后,研磨成粉状。称取该粉末0.050g为待测样品。

1.2.3 自由基含量的测定方法 将制备的样品直接用电子自旋共振波谱仪(JES-FEIX G ESR SPECTROMER日本产)进行自由基含量的测定。测试工作条件:中心磁场为3360±100G,微波功率为0.2mW,调制为6.3G,放大倍数为×100。以自由基信号幅值h(mm)表示样品的自由基含量。

## 2 结果与讨论

大豆接种后叶片中自由基含量的变化率按下式计算:

$$\text{自由基变化率}(\%) = (h_1 - h_0) / h_0 \times 100$$

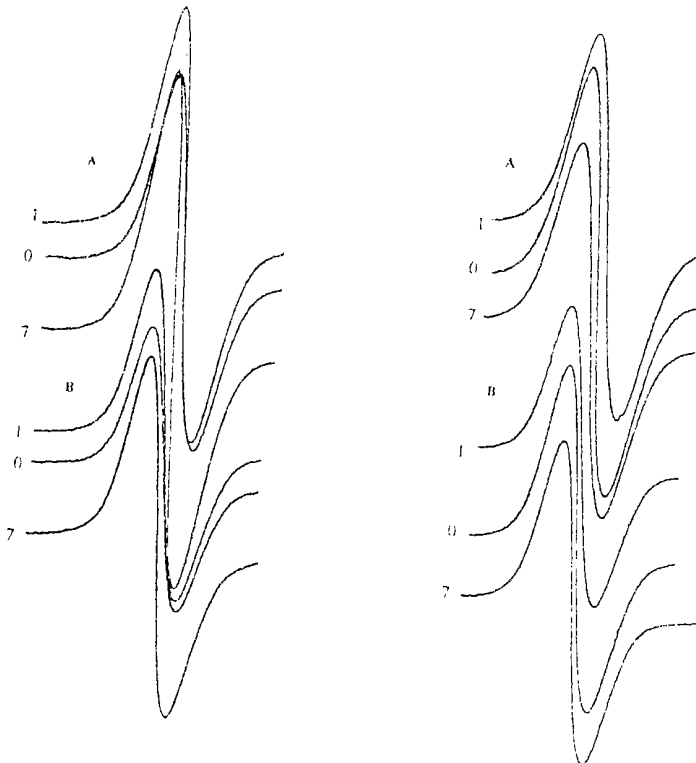


图1 大豆抗感品种接种灰斑病菌后自由基变化波谱图(I. 东农9674, II. 东农1330; A、B分别代表接种后第1、3天; 0-对照; 1、7分别代表接种1、7号生理小种)

Fig. 1 ESR spectra of the free radical changes in soybean leaves infected by *Cercospora sojina* Hara (I - D. N. 9674, II - D. N. 1330; A, B- 1, 3 days after inoculation; 0- Contrast; 1, 7- inoculation with the race No. 1 or No. 7)

其中  $h_0$   $h_1$ — 分别为未接种对照和接种后大豆叶片中自由基信号幅值 (mm)。图 1 为大豆抗病品种东农 9674 和感病品种东农 1330 接种灰斑病菌 17 号生理小种后第 13 天的叶片中自由基及相应对照的波谱图。

2.1 供试品种对灰斑病菌 17 号生理小种的抗感反应

按大豆灰斑病的抗感标准<sup>[2]</sup>, 在接种后第 10 天调查 5 个品种的抗感反应, 结果如表 1。在接种后保湿 48 小时条件下, 感病品种在接种后第 8 天叶片上就有病斑出现, 到第 10 天时有大量的病斑显症; 而抗病品种东农 9674 和农大 13699 叶片上没有出现病斑。这与往年的抗感反应结果基本一致<sup>[3]</sup>。

表 1 供试品种对灰斑病菌 17 号生理小种的抗感反应

Table 1 The reaction of soybeans infected by 1,7 races of *Cercospora sojina* Hara

品种	东农 9674	农大 13699	东农 1330	东农 Z44	黑农 39
Varieties	D. N. 9674	ND13699	D. N. 1330	D. N. Z44	H. N. 39
反应	抗	抗	感	感	感
Reaction	R	R	S	S	S

2.2 抗感品种叶片中自由基含量的差异

分别计算抗感品种对照组的叶片中自由基含量的平均值, 结果如表 2。

表 2 抗感品种健康植株叶片中平均自由基含量

Table 2 The free radical in leaves of the contrast plant of varieties tested

品种	自由基含量 The free radical (mm)					t 值
	1d <sup>a</sup>	3d	5d	7d	10d	
抗病品种	90.5	72.5	86.5	77.0	92.5	- 15.645 <sup>*</sup> *
感病品种	105.3	94.6	102.0	104.3	107.3	

\* 表中 1d 等时间代表接种后取样时间。 \* 1d et al the time after inoculation.

\*\* 在 0.01 水平上极显著。 \*\* significant at 0.01.

从表 2 中可见, 在未接种灰斑病菌时, 抗病品种叶片中自由基含量明显低于感病品种的, 而且抗感品种之间叶片中自由基含量差异极显著。

供试品种接种 17 号生理小种后, 叶片中自由基含量与相应对照的自由基含量 t 测验的结果表明: 与相应对照相比, 抗病品种接种后叶片中自由基含量的发生了极显著的变化; 而感病品种接种后自由基含量的变化不显著。

2.3 抗病品种接种后叶片中自由基含量的变化规律

从图 2 可见, 接种灰斑病菌 1 号生理小种后, 东农 9674 叶片中自由基在第 1 天比对照明显增高 (增加 17.0%), 以后自由基的含量随着病情的发展又继续升高, 在第 7 天自由基含量的变化率最大, 为 35.0%; 而接种 7 号生理小种后, 东农 9674 在第 1 天叶片中自由基含量增加的幅度最大, 为 38.0%, 而且随着病情的发展, 东农 9674 叶片中自由基含量呈下降趋势, 但也一直高于对照。如图 3 农大 13699 接种 17 号生理小种后, 叶片中的自由基含量均是在接种后第 7 天变化的幅度最大, 分别比对照高 33.8% 和 31.1%, 但接种 7 号生理小种后第 5 天叶片中自由基含量略低于对照 3.5%。

由此可见, 抗病品种接种灰斑病菌 17 号生理小种后, 叶片中自由基含量总体上均高

于相应的对照。

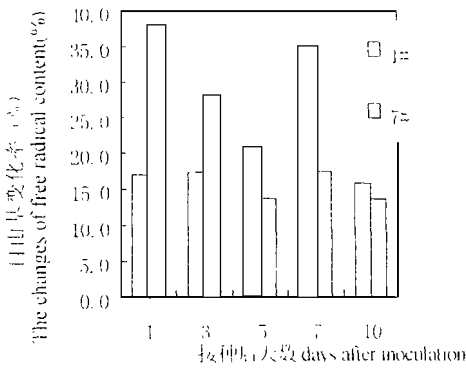


图 2 东农 9674 接种灰斑病菌后自由基含量的变化

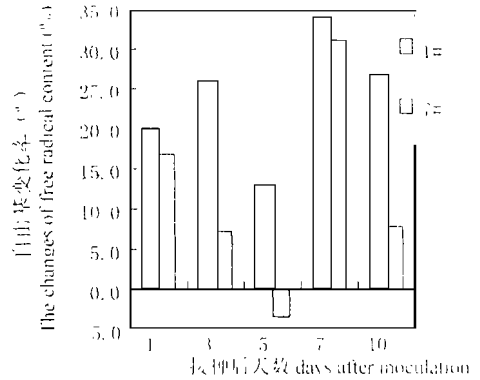


图 3 农大 13699 接种灰斑病菌后自由基含量的变化

Fig. 2 The free radical content changes in Dongnong 9674 leaves after inoculation

Fig. 3 The free radical content changes in Nongda 13699 leaves after inoculation

2.4 感病品种接种后叶片中自由基含量的变化规律

如图 4,感病品种东农 1330 接种灰斑病菌 1 号生理小种后,叶片中自由基含量随着病情的发展而呈下降趋势。在接种后第 5 天下降的幅度最大,比对照低 17.2%,而后再呈上升趋势,并且在接种后第 10 天比对照增加了 2.0%;接种 7 号生理小种后,叶片中自由基含量在接种后第 1 天比对照降低了 12.2%,而且降低的幅度最大,然后随着病情的发展呈上升趋势,在接种后第 5 天以后均比对照高,但增加的幅度非常小,最大增加 2.0%。

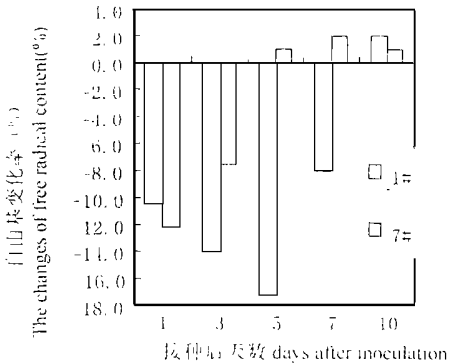


图 4 东农 1330 接种灰斑病菌后自由基含量的变化

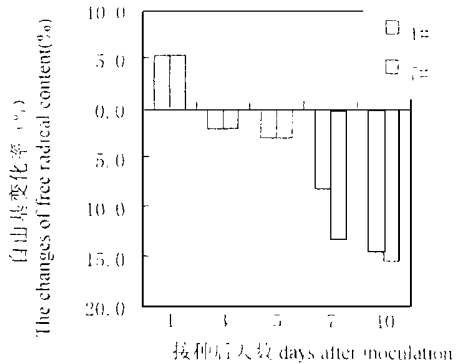


图 5 东农 244 接种灰斑病菌后自由基含量的变化

Fig. 4 The free radical content changes in Dongnong 1330 leaves after inoculation

Fig. 5 The free radical content changes in Dongnong 244 leaves after inoculation

对于东农 244 来讲,接种 1 号和 7 号生理小种后,叶片中自由基含量的变化趋势基本一致,即均在接种后第 1 天叶片中自由基含量比对照高,但随着病情的发展又呈下降趋势,且低于对照(如图 5)。

黑农 39 接种 1 号生理小种后,叶片内自由基含量在接种后第 1 天高于对照 6.6%,以后叶片内自由基含量呈下降趋势,并低于对照,而在第 10 天自由基含量又与对照相同;接种 7 号生理小种后,叶片内自由基含量在接种后只在第 5 天高于对照 6.5%,其它时期

均低于对照 (如图 6)。

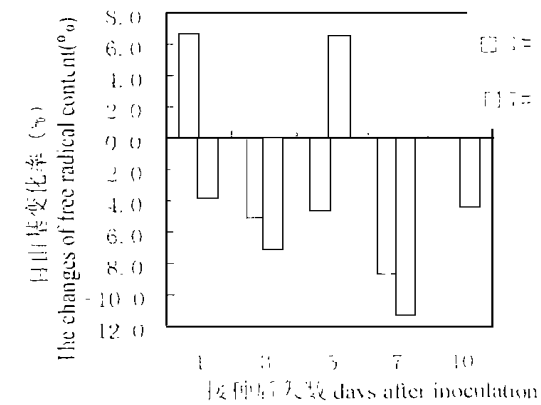


图 6 黑农 39 接种灰斑病菌后自由基含量的变化  
Fig. 6 The free radical content changes in HeiNong 39 leaves after inoculation

综上所述,接种灰斑病菌 17 号生理小种后,抗病品种叶片中自由基含量变化的总趋势是均比相应对照有所增加,而感病品种叶片中自由基含量变化总的趋势是比相应的对照有所降低;并且品种的自由基含量变化的幅度以及变化的趋势因生理小种而不同,但是,自由基含量的变化是否具有小种专化性有待于进一步研究。从本研究的结果,即接种 17 号生理小种后对不同抗性大豆品种自由基含量的影响来看,灰斑病菌 17 号生理小种的确具有不同的致病基因,这与张晓刚<sup>[4]</sup>的研究结果基本一致。

参 考 文 献

1 方允中,李杰主编,自由基与酶—基础理论及其在生物学和医学中的应用,科学出版社,北京 1989  
2 张丽娟,杨庆凯,大豆抗灰斑病菌多个生理小种资源的筛选,大豆科学,1997,16(1): 38- 41  
3 张丽娟,大豆灰斑病抗源的筛选和单生理小种鉴别寄主的建立,东北农业大学硕士学位论文,1995  
4 张晓刚,大豆对灰斑病( *Cercospora sojae* Hara)的抗性遗传研究,东北农学院博士学位论文,1991

STUDY ON THE FREE RADICAL OF SOYBEAN LEAVES INFECTED WITH 1, 7 RACES OF *Cercospora sojae* HARA

Zhang Lijuan Yang Qingkai Sun Jinlan

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract** The free radicals in soybean leaves infected with 1, 7 races of *Cercospora sojae* Hara were measured by ESR. The results showed that the free radical in leaves of the resistant varieties at various time after inoculation was higher than those of their contrast plants, and the free radical in the leaves of susceptible varieties was lower than those of their contrast plants. Furthermore, the changes of free radical in leaves of varieties tested were somewhat correlated with the host resistance or susceptibility to *Cercospora sojae* Hara.

**Key words** Soybean; *Cercospora sojae* Hara; ESR; Free radical