

接种疫霉根腐病菌对大豆抗坏血酸氧化酶的影响

孙 欣^{1,2}, 刘丽君¹, 李 莉²

(1. 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要 对不同抗、感病品种接种疫霉根腐菌1号生理小种前及24 h、48 h、72 h、96 h后测定叶片中抗坏血酸氧化酶单位的变化特点进行分析, 探讨了该酶在抗大豆疫霉根腐病的作用。结果表明, 抗病品种酶单位呈现上升下降再上升的变化趋势, 感病品种酶单位呈现上升再下降的变化趋势。

关键词 大豆疫霉根腐病; 抗坏血酸氧化酶; 酶单位

中图分类号 S435.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0287-03

CHANGES OF AAO ACTIVITY IN SOYBEAN LEAVES OF DIFFERENT RESISTANT VARIETIES INOCULATED BY *PHYTOPHTHORA SOJAE*

SUN Xin^{1,2}, LIU Li-jun¹, LI Li²

(1. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin 150086; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract To investigate the effect of *Phytophthora sojae* on the ascorbic acid dase(AAO), varieties with different resistance were inoculated by *Phytophthora sojae* racer, and the changes of AAO activity was measured. Results showed that the AAO activities behaved a course of raise decline and then raise again in the resistant varieties, while a course of raise and then decline was observed in susceptible one.

Key words *Phytophthora sojae*; Ascorbic acid oxidase(AAO); Eenzymatic activity

大豆疫霉根腐病(*Phytophthora sojae*)是一种危害严重的疫霉病害。由于其土传的特性和极强的生存能力, 该病害迄今在世界大豆主产区仍呈扩大蔓延之势^[2]。美国等国家在20世纪50年代就对该病进行了系统的研究, 但主要集中在对生理小种的鉴定、病害的流行、抗性机制、抗原筛选以及病害的防治等方面, 取得了较大的进展, 而对于抗病性的生理生化机制研究很少^[1], 目前对该病的抗病性与酶活性之间关系的研究报道一直集中于超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶这一类酶上, 对氧化酶、

次生代谢酶的研究报道很少。

抗坏血酸氧化酶(AAO)存在于植物体的细胞质中, 是植物体中普遍存在的一种含铜的氧化酶, 是呼吸链末端氧化酶的一种^[3], 它催化分子氧将抗坏血酸氧化为脱氢抗坏血酸^[4], 其过程常与谷胱甘肽、NADPH(或NADH)的氧化还原相偶联, 形成一个以抗坏血酸氧化酶系统为末端的氧化还原系统。一些研究者发现, 植物体中的抗坏血酸氧化酶活性变化抗病性有关^[5], 目前尚未发现有关大豆抗病性与抗坏血酸氧化酶活性之间关系的研究报道。试验

收稿日期: 2006-11-24

基金项目: 国家“863”项目(2006AA1021F9); 国家“948”项目基金资助(2006-G5)。

作者简介: 孙欣(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向植物基因工程与分子生物学。

通讯作者: 刘丽君研究员, E-mail: nkyssbd@126.com

通过对 3 个抗病大豆品种和 4 个感病大豆品种接种大豆疫霉根腐菌 1 号生理小种后叶片中抗坏血酸氧化酶活性变化进行研究,初步探讨抗坏血酸氧化酶与大豆疫霉根腐病抗性的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试品种 抗病品种: Darby、Hobbit、Kottman 抗线 2 号;感病品种:绥农 14 号、黑河 19 号、黑农 35 号、合丰 25 号。

1.1.2 供试菌株 大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种。

1.2 试验方法

1.2.1 种植及接种方法 采用盆栽,每品种种植 25 株,在第二对复叶展开后用大豆疫霉根腐菌 1 号生理小种于子叶上方对各材料进行伤口涂抹接种,接种后套袋保湿并放置于阴凉处。

1.2.2 取样方法 接种前及接种 24 h、48 h、72 h、96 h 后采集各品种叶片 5 g,(同一时间采集的叶片位置相同)叶片采集后立即放入冰盒中,在 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.3 AAO 酶液的提取及酶单位的测定方法 取各时期各材料叶片 1 g,剪碎后于预冷的研钵中加少量 pH6.0 磷酸盐缓冲液(预冷)及少量石英砂迅速研磨至匀浆,把全部材料用缓冲液洗入 25 mL 量瓶中,并用缓冲液定容,放在 18 ℃ ~20 ℃ 水浴上浸提 30 min,上清液为酶提取液。分别取三只三角瓶,标号,1[#]瓶空白测定:4 mL 缓冲液、2 mL 抗坏血酸(0.1%)、1 mL 偏磷酸(10%);2[#]瓶测定:4 mL 缓冲液、2 mL 抗坏血酸;3[#]瓶测定:4 mL 缓冲液、2 mL 抗坏血酸。向各瓶中加入酶提取液 2 mL,水浴中保温 10 min 后向 2、3 号瓶中加入 1 mL 偏磷酸终止反应。各加入 3 滴淀粉溶液做指示剂,用微量滴定管以 5/6 mmol · L⁻¹ 碘液进行滴定至出现浅蓝色为止,记录滴定值。由计算公式:抗坏血酸氧化酶单位 = 0.44V[V₃ - (V₁ + V₂)/2] (awt)⁻¹ 计算酶单位,其中 V₁ = 滴定 1 号瓶所用碘液毫升数;V₂ = 滴定 2 号瓶所用碘液毫升数;V₃ = 滴定 3 号空白瓶所用碘液毫升数;V = 酶提取液总体积(mL);0.44 = 每毫升 5/6 mM 碘液氧化抗坏血酸毫克数;a = 测定时所用提取液毫升数;w = 样品鲜重(g);t = 测定时间(min),用 mg · g⁻¹ · min⁻¹ 表示酶单位单位。(反应进行中室温控制在 20 ℃)

2 结果

由图 1、图 2 可以看出接种前在正常生长条件下,三种抗病大豆品种叶片中 AAO 酶单位在 0.02 ~0.08 mg · g⁻¹ · min⁻¹之间,四种感病品种叶片内 AAO 酶单位在 0.02 ~0.07 mg · g⁻¹ · min⁻¹之间,抗感类型之间无太大差异,证明在无病害侵染条件下,同一栽培条件下不同品种大豆叶片内 AAO 酶单位基本相同。

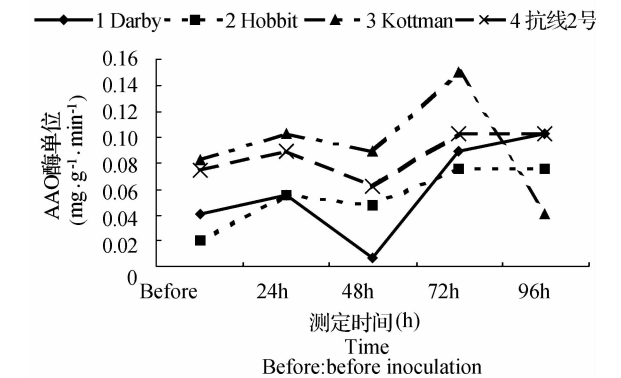


图 1 接种大豆疫霉根腐菌 1 号生理小种前及接种后抗病品种 AAO 酶单位变化
Fig. 1 Changes of the AAO enzymatic activity before and after inoculated in the resistant cultivars

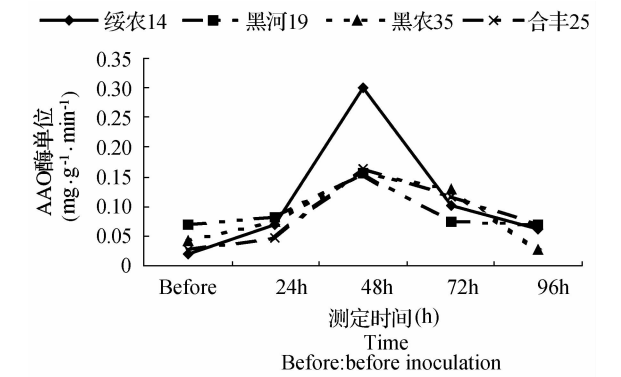


图 2 接种大豆疫霉根腐菌 1 号生理小种前及接种后感病品种 AAO 酶单位变化
Fig. 2 Changes of the AAO enzymatic activity before and after inoculated in the susceptible cultivars

由图 1 可以看出,对于抗病品种,在接种疫霉 1 号生理小种 24 h 后叶片内 AAO 酶单位呈现上升变化,48 h 后 AAO 酶单位下降,72 h 后 AAO 酶单位再次上升且活性均高于 24 h 后测定值,96 h 后除 Kottman 品种 AAO 酶单位大幅度下降外,其它两抗病品种 AAO 活性有小幅上升。

由图3可以看出,对于感病品种,在接种疫霉1号生理小种24 h后叶片内AAO酶单位呈现上升变化,48 h后AAO酶单位上升至最大值,72 h后AAO酶单位下降但活性均高于24 h后测定值,96 h后AAO酶单位降至最低值。

3 分析与讨论

植物感病后的一个重要的生理变化就是呼吸作用的增加,耗氧量增加。在植物感病后,有氧呼吸中的戊糖磷酸途径(PPP)可以占到全部呼吸的50%以上,而抗坏血酸氧化酶可以与PPP途径中所产生的NAPDH起作用^[4],KiraiV和Farkas观察到呼吸作用的增加与抗坏血酸氧化酶单位的增加成平行关系,并且磷酸戊糖途径的电子传递通过有抗坏血酸参加的抗坏血酸氧化酶系统。抗坏血酸氧化酶作为呼吸电子传递链末端氧化酶的一种,其活性的增加表明在病原菌侵染过程中植株呼吸作用增强,能够促进伤口附近的木栓形成层,加快伤口愈合速度,将健康组织与受病害组织分离,抵御病原菌的进一步侵染。

本研究中对AAO酶单位变化测定发现,无论是抗病品种还是感病品种在接种后24 h内AAO酶单位均呈现上升变化,呼吸加强,证明在疫霉根腐病菌侵染大豆植株的过程中,抗坏血酸氧化酶参与了对疫霉根腐病的抗性反应。其中抗病品种,在接种24

~48 h内酶单位开始下降,说明在病原菌侵染过程中,抗坏血酸氧化酶大量快速参与抗病反应,抵御病原菌进一步侵染,暂时抑制了病原菌的侵染,反应强度减弱,整个过程中新酶不断的被合成参与到抗病反应中,从48 h后酶单位不断上升,加快木栓形成层的合成,抵抗病原菌的入侵和病原菌对植株的毒害作用,最终达到抗病目的。而感病品种在24~48 h内酶单位继续上升,说明该酶继续参与对病原菌侵入的抵抗过程,但感病植株最终无法抵御病原菌的侵染以及其毒害作用而逐渐发病,因此48 h后酶单位不断下降。

参 考 文 献

- [1] 吴俊江,刘丽君,高明杰,等. 大豆接种疫霉根腐病菌后过氧化物酶活性的变化[J]. 中国油料作物学报,2003,25(3):67-70.
- [2] 刘亚光,李海英,杨庆凯. 大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究[J]. 大豆科学,2002,21(3):195-198.
- [3] 潘瑞炽,董愚得. 植物生理学(第3版)[M]. 北京:高等教育出版社,1995.
- [4] 王忠. 植物生理学(农学、园艺、植保、土壤等专业用)[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [5] 徐健容,叶华智. 抗坏血酸氧化酶与小麦抗赤霉病关系的研究[J]. 四川农业大学学报,1998,16(3):319-321.