

# 灰斑病菌(*Cercospora soja* Hara)对 大豆保护酶体系的影响\*

刘丽君 高明杰 郑蔚红

(黑龙江省农业科学院大豆所)(齐齐哈尔师范学院)

陈连文 张云生 闫晓东

(松花江地区农业推广中心) (宝泉岭农科所)

## 摘 要

本文从膜质过氧化反应及保护酶体系的变化、过氧化物酶、苹果酶脱氢酶同工酶的表达特性,分析了抗性不同的大豆品种对灰斑病1、7、8号小种的生理生化反应。研究结果表明:在灰斑病1、7、8号小种侵染下,感病品种膜质过氧化水平加重,保护酶体系失去活力,而抗病品种,虽然丙二醛(MDA)含量有所增加,但膜质的保护酶系统活性都很强,植株受害较轻。而过氧化物酶、苹果酸脱氢酶同工酶的变化反应了品种对灰斑病的抗性,这两个同工酶的协同反应,标志着品种抗灰斑病的特性。

**关键词** 灰斑病;保护酶;膜质过氧化

大豆灰斑病是一种世界性病害,种植感病品种一般减产10—29%,严重时可在50%以上,1994年黑龙江省灰斑病大发生,造成生产、出口和经济上的巨大损失。因此,开展灰斑病的深入研究就更日趋重要。近些年来,许多学者相继在大豆灰斑病的病理<sup>[3,8]</sup>、遗传<sup>[4,6]</sup>、育种<sup>[4]</sup>、抗性遗传<sup>[9]</sup>、资源筛选方面做了许多工作,而在分子标记和抗性机制方面报道甚少。本文从膜质过氧化反应及保护酶体系的变化入手,探讨大豆抗灰斑病的抗性机制,为大豆抗灰斑病的生化标记及鉴定提供理论依据。

\* 省自然科学基金资助项目

本文于1995年3月10日收到。

This paper was received on March 10, 1995.

## 材料和方法

1. 供试材料:东农 593、东农 9674、合丰 33、黑农 39、绥农 8 号、绥农 4 号。
2. 供试菌种:大豆灰斑病生理小种 1 号、7 号、8 号,由东北农业大学大豆研究所提供。
3. 接种与取样:供试材料的每品种(系)播 24 盆,每盆 4 株,当第三复叶完全展开时,移入接菌池,用超低量喷雾器喷雾接菌。接菌后遮光保湿 24 小时。发病后,3 天内取接种和未接种的复叶进行测定,3 次重复。

4. 样品分析方法:苹果酸脱氢酶和过氧化物同工酶采用 PAGE 电泳检测技术。苹果酸脱氢酶的染色:1mol/L L-苹果酸钠盐底物深液配以辅酶 I 和 NBT、PMS 的 0.2mol/L、Tris-HCl 缓冲液。

过氧化物酶的染色:采用醋酸联苯胺染色法。

超氧化物歧化酶的测定:采用 NBT 法<sup>[1]</sup>进行。

丙二醛含量的测定:参照王爱国 1986 年的方法进行<sup>[2]</sup>。

## 结 果

### (一)大豆品种(系)对灰斑病生理小种的抗性反应。

不同抗性的大豆品种在接种灰斑病 1 号、7 号、8 号生理小种后,对各灰斑病小种的抗性是不同的,从表 1 可以看到,对各生理小种抗性表现较好的为东农 9674 和合丰 33,感病较重的为黑农 39。

表 1 不同大豆品种接种灰斑病生理小种后的抗性反应

Table 1 Resistant reaction of different cultivars inoculated with different physiological race of Frogeye leaf spot

品 种 Cultivars	灰斑病 1 号小种 FLS No. 1	灰斑病 7 号小种 FLS No. 7	灰斑病 8 号小种 FLS No. 8
东农 593 Dong Nong 593	R	S	SS
东农 9674 Dong Nong 9674	R	R	R
合丰 33 He Feng 33	R	R	R
黑农 39 Hei Nong 39	S	S	S
绥农 8 号 Sui Nong 8	R	R	SS
绥农 4 号 Sui Nong 4	SS	S	R

R:2 级以上抗病

S:感病

SS:重感

R:Resistance

S:Susceptible

SS:Severe susceptible

## (二) 灰斑病 1 号小种侵染大豆后的膜质过氧化水平

丙二醛 (Malondialdehyde 简称: MDA) 是膜质过氧化的有毒代谢产物, 而超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase 简称: SOD)、过氧化氢酶则是细胞膜免受过氧化的两个保护酶, 它在清除自由基, 提高体内的抗逆性方面起到了重要的作用。通过 MDA、SOD、过氧化氢酶的变化, 可反应品种在病原菌侵染条件下, 膜质的过氧化水平, 从表 2 可以看到: 不同类型的大豆品种在接种灰斑病 1 号后, 感病品种的 MDA 含量增加较多, 膜质过氧化水平加重。对高感品种绥农 4 号来说, 它的两个保护酶体系的酶活性都降低了。而一般感病品种, 黑农 39, 它的两个酶系统仍具有一定的活性。由此说明: 当膜质的过氧化水平加重时, 如果保护酶体系失去活力, 则防御体系就不存在了, 因而使大豆表现出许多病症。而抗病品种, 虽然 MDA 含量有所增加, 但它的两个保护酶系统活性都很强, 清除有毒代谢产物——氧自由基的能力很强, 而使膜质过氧化程度相对较低, 植株受害较轻。

表 2 对灰斑病 1 号生理小种侵染后的膜质过氧化反应

Table 2 Membranous peroxidatic reaction of different cultivars inoculated with FLS No. 1

品 种 Cultivars	对灰斑病 1 号生理小 种的抗性 反应 Resistant reaction	MDA 含量 ( $\mu\text{mol/L}$ g. fw) MDA content	与 ck 相比 的变化 Relative change comparative with ck	SOD 酶的 活性 Activity of SOD	与 ck 相比 的变化 Relative change comparative with ck	过氧化氢 酶的含 量 ( $\text{mg/g} \cdot \text{分}$ ) Hydrogen peroxidase content	与 ck 相比 的变化 Relative change comparative with ck
合丰 33 He Feng 33	R	5.9064 <sup>-0.3</sup>	6.0%	2046.27	+144.17%	8.86	+176.20%
绥农 4 号 Sui Hong 4	SS	5.414 <sup>-0.3</sup>	45.0%	1568.12	-15.98%	1.72	-66.6%
绥农 8 号 Sui Nong 8	R	6.035 <sup>-0.3</sup>	-12.0%	2200.52	+65.89%	3.43	+233.01%
黑农 39 Hei Nong 39	S	6.0313 <sup>-0.3</sup>	+58.0%	2483.29	+40.4%	2.75	+298.55%
东农 593 Dong Nong 593	R	5.992 <sup>-0.3</sup>	+10.0%	1197.94	+6.9%	7.03	+20.38%
东农 9674 Dong Nong 9674	R	7.276 <sup>-0.3</sup>	+41.0%	1789.21	+9.43%	7.04	+501.7%

## (三) 灰斑病 7 号小种侵染大豆后的膜质过氧化水平

参试品种在灰斑病 7 号小种的侵染条件下, 膜质过氧化水平加重, 抗性品种其表现为: 丙二醛含量产生少一些, 两个保护酶体系的酶活力较强。而感病品种, 膜质的过氧化程度较重, 表现为丙二醛含量增加幅度较大, 只有一个保护酶清除氧自由基的能力较强。

表 3 不同大豆品种对灰斑病 7 号生理小种侵染后的膜质过氧化反应

Table 3 Membranous peroxidatic reaction of different cultivars inoculated with FLS No. 7

品 种 Cultivars	对灰斑病 7 号生理小 种的抗性 反应 Resistant reaction to FLS No. 7	MDA 含量 ( $\mu\text{mol/L} \cdot$ $\text{g} \cdot \text{Fw}$ ) MDA content	与 ck 相比 的 变 化 (%) Relative change comparative with ck	SOD 酶的 活性 Activity of SOD	与 ck 相比 的变化 Relative change comparative with ck	过氧化氢 酶含量 $\text{mg/s}$ (鲜 重) Hydrogen peroxidase content	与 ck 相比 的 变 化 (%) Relative change comparative with ck
绥农 4 号 Sui Nong 4	S	3.017 <sup>-03</sup>	+6.28%	272.49	-85.39%	7.55	+46.61%
东农 593 Dong Nong 593	S	6.44 <sup>-03</sup>	+18.0%	1969.15	+75.69%	1.48	-74.66%
东农 9674 Dong Nong 9674	R	5.35 <sup>-03</sup>	+4.0%	1840.62	+12.58%	1.24	+5.96%
合丰 33 He Feng 33	R	5.767 <sup>-03</sup>	+4.0%	1249.36	+49.08%	0.06	+60.0%
黑农 39 Hei Nong 39	S	5.14 <sup>-03</sup>	+28.0%	1377.89	-22.09%	4.36	+531.89%
绥农 8 号 Sui Nong 8	R	7.255 <sup>-03</sup>	+6.0%	1840.62	+38.15%	2.40	+133.01%

## (四) 灰斑病 8 号小种侵染大豆后的膜质过氧化水平

表 4 不同大豆品种对灰斑病 8 号生理小种的膜质过氧化反应

Table 4 Membranous peroxidatic reaction of different cultivars inoculated with FLS No. 8

品 种 Cultivars	对 8 号灰 斑病的抗 性反应 Resistant reaction to FLS No. 8	MDA 含量 ( $\mu\text{mol/L} \cdot$ $\text{g} \cdot \text{Fw}$ ) MDA content	与 ck 相比 的 变 化 (%) Relative change comparative with ck.	SOD 酶活 性 Activity of SOD	与 ck 相比 的 变 化 (%) Relative comparative with ck	过氧化氢 酶的 含 量 $\text{mg/g}$ (鲜 重) Hydrogen peroxidase content	与 ck 相比 的 变 化 (%) Relative change comparative with ck
绥农 4 号 Sui Nong 4	R	3.702 <sup>-03</sup>	-1.0%	966.58	-48.0%	2.13	-58.64%
合丰 33 He Feng 33	R	3.525 <sup>-03</sup>	-37.0%	1588.69	+89.56%	4.12	+8140.0%
东农 9674 Dong Nong 9674	R	4.45 <sup>-03</sup>	-14.0%	1532.13	-6.29%	5.15	+340.17%
东农 593 Dong Nong 593	SS	8.924 <sup>-03</sup>	+64.0%	1634.96	+45.87%	2.44	-58.22%
绥农 8 号 Sui Nong 8	SS	11.84 <sup>-03</sup>	+76.47%	1737.79	+31.01%	0.56	-43.69%
黑农 39 Hei Nong 39	S	4.665 <sup>-03</sup>	+17.0%	452.44	-74.41%	0.07	-89.86%

不同抗性的大豆品种对灰斑病 8 号小种的生化反应是不同的。抗病品种被灰斑病 8

号小种侵染后,MDA 含量降低,对多抗性品种来说,主要是它的两个保护酶活性变化较大。如合丰 33:SOD 和过氧化氢酶活性与 ck 相比变化较大,故使细胞内有毒代谢产物,被迅速清除掉。而感病品种,则发生较强的膜质过氧化,有毒的代谢产物积累。

#### (五)灰斑病生理小种对大豆过氧化物酶、苹果酸脱氢酶的反应

过氧化物酶是植物体内的一种保护酶,抗性不同的大豆品种对灰斑病的反应表现为:过氧化物酶同工酶的数量增多了,抗病性较好的材料,过氧化物酶同工酶的表达与 ck 相比变化不大,只增加 1—2 条酶带,而感病品种,与 ck 相比变化较大。有些原来表达的基因,在接种后没有表达并增加了许多新谱带,对某些小种感病较重时,过氧化物同工酶的表达的数量与 ck 相比有所减少(图 1)。

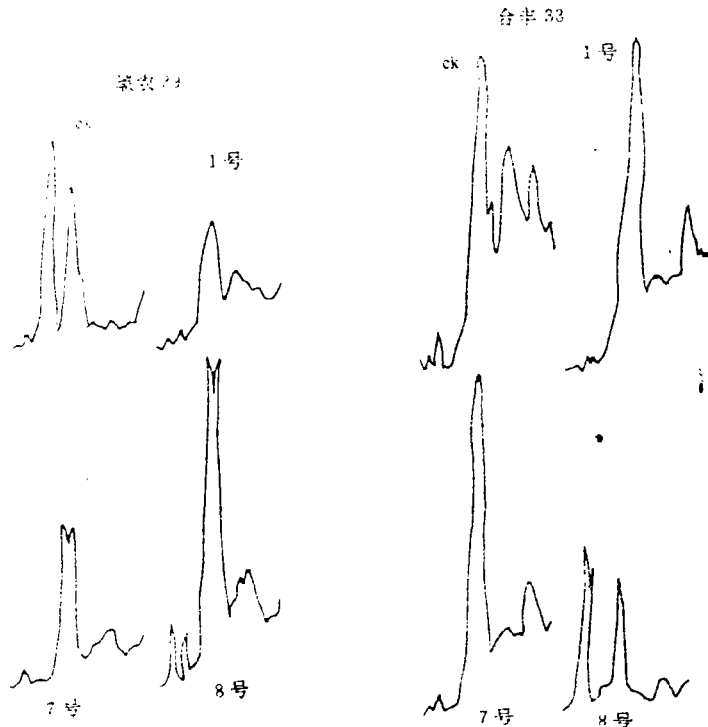


图 1 大豆灰斑病对抗性不同大豆品种过氧化物酶同工酶活性的影响

Fig. 1 Effect of FLS on peroxidase activity of different cultivars

抗性不同的大豆品种接种灰斑病菌后,品种的苹果酸脱氢酶变化较大,谱带类型变化较丰富,抗病品种谱型变化较少,如东农 9674,接种 1,7 号小种后,苹果酸脱氢酶的谱型与 ck 相比,谱型没有变化,酶活性略有降低,只有接种 8 号小种后,缺失了二条谱带。合丰 33 在灰斑病 7 号、8 号小种侵染条件下,谱型与 ck 相比无明显的变化,灰斑病 1 号小种侵染后,迁移率为 0.13 的这条谱带没有表达。而感病品种如绥农 4 号,接种灰斑病后,谱带变化较大。

表 5 不同大豆品种接种灰斑病后苹果酸脱氢酶同工酶的表达  
Table 5 Malic dehydrogenase isozyme patterns of cultivars inoculated with FLS

品 种 Cultivars	灰斑病小种 Physiological race of FLS	谱带显示情况 Isozyme bands							
		Rf=	0.13	0.31	0.36	0.43	0.46	0.49	0.53
绥农 4 号 Sui Nong 4	ck		+		+	+	+	+	+
	1 号				+	+	+	+	+
	7 号				+	+	+		
	8 号				+	+	+		
东农 9674 Dong Nang 9674	ck		+	+	+	+	+	+	
	1 号		+	+	+	+	+	+	
	7 号		+	+	+	+	+	+	
	8 号				+	+	+	+	
合丰 33 He Feng 33	ck		+		+	+	+	+	
	1 号				+	+	+	+	
	7 号		+		+	+	+	+	
	8 号		+		+	+	+		
黑农 39 Hei Nong 39	ck		+		+	+	+	+	
	1 号				+	+	+		
	7 号				+	+	+	+	
	8 号				+	+	+	+	

## 讨 论

许多学者研究认为:植物的抗病性是膜质的过氧化水平和保护酶体系密切相关的。在我们的试验中,也证实了这一点:感染大豆灰斑病后,抗病品种 MDA 含量略有增加,同时清除自由基的两个保护酶体系的酶活性都很强。而感病品种的 MDA 含量增加幅度较大,保护酶体系中的酶活性降低。鉴于 SOD,过氧化氢酶等在清除自由基方面的特殊保护作用,这些保护酶活性的变化及膜质过氧化水平的高低,可作为评定品种抗病性大小的指标。

过氧化物酶同工酶的表达与活性的变化与品种的抗病性是有关的。苹果酸脱氢酶的变化反应了品种对灰斑病各生理小种的反应程度。这两个酶的协同反应,标志着品种抗灰斑病的特性。

## 参 考 文 献

- [1] 王爱国等,1983,大豆超氧化物歧化酶的研究,《植物生理学报》9:77—83。
- [2] 王爱国等,1986a,丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨,《植物生理学通讯》(2):57—55

- [3] 庄炳昌等,1993,抗性不同大豆品种感染灰斑病后若干生化反应,《作物学报》Vol. 19. NO. 16 567-570
- [4] 刘忠堂,1983,大豆灰斑病(*Cercospora sojina* Hara)抗病性的遗传分析《大豆科学》Vol. 2 NO. 4. 322-325
- [5] 杜良成、王钧,1990,病源相关蛋白及其在植物抗病中的作用《植物生理学通讯》(4),1~6
- [6] 张广群等,1990,大豆F<sub>2</sub>代叶部抗、感灰斑病株群的病粒率比较,《黑龙江八一农垦大学学报》(2),15-19
- [7] Bors W, Saran M, Michel C. Assays of oxygen radicals, Methods and Mechanisms. In oberley LW(ed), Superoxide Dismutase. Vol. I. CRC Press, Boca Raton. 1982, P31.
- [8] Boreris A, 1982, Cadenas E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In Oberley LW(ed), Superoxide Dismutase, CRC Press, Boca Raton P25.
- [9] Athow K. L. et al. A. H. Probat, 1952 The inheritance of resistance to frog-eye leaf spot of soybeans. Phytopath. 42,660-662

## EFFECT OF *CERCOSPORA SOJINA* HARA(FROGEYE LEAF SPOT) ON PROTECTIVE ENZYME SYSTEM OF SOYBEAN

Liu Lijun Gao Mingjie

(Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science)

Zheng Weihong

(Department of Biology, Qiqihar Teachers College)

### Abstract

Physiological and biochemical reactions of different soybean cultivars inoculated with FLS No. 1. 7. 8. were studied by means of study on change of membraneous peroxidatic reaction, protective enzyme system, peroxidase and malic dehydrogenase isozyme. The results showed; the membraneous peroxidatic reaction of susceptible cultivars was more serious after inoculated with FLS, and the activity of protective enzyme system became lost, The MDA content of resistant cultivars had some increase, but the activity of protective enzyme system was very active and disease infection on plants was not serious. The variation of reactivon of the isozymes reflected the degree resistance of the cultivars to FLS. The coordinate reaction of the demonstrated the nature of resistance of soybean cultivars to FLS.