

玉米小斑病菌 小种毒素诱导对玉米叶片 苯丙氨酸解氨酶活性的影响

马春红¹ 翟彩霞² 郑秋玲³
董文琦⁴ 李运朝¹ 崔四平¹ 范尉尉⁵ 贾银锁^{1**}

1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 石家庄 050051;
2. 河北省农林科学院农业资源环境研究所, 石家庄 050051; 3. 河北省农林科学院滨海农业研究所, 唐海 063200;
4. 河北省农林科学院科技处, 石家庄 050051; 5. 河北省石家庄市疾病预防控制中心, 石家庄 050011

摘要 分别采用低浓度玉米小斑病菌 *Helminthosporium maydis* T小种毒素(HMT毒素)和玉米小斑病菌 T小种培养滤液中的提取蛋白及菌丝细胞壁的提取液, 预处理不同玉米品种3叶期叶片后再接种高浓度 HMT毒素, 在无菌条件下培养5 d后测量叶片病斑大小, 并测定玉米叶片内苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化。结果表明: 只有纯化的低浓度 HMT毒素能够作为激发子诱导玉米获得系统性广谱抗性, 但不同玉米品种所需的最适合浓度有差异; TC103以质量浓度0.025 μg/mL毒素预处理效果最好, PAL活性最高; TB37和 TMo17 2个自交系, 以质量浓度分别为0.025 μg/mL和0.050 μg/mL的毒素预处理效果最好。

关键词 玉米小斑病菌 T小种; 毒素; 激发子; 苯丙氨酸解氨酶

中图分类号 S 435.131.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0021-05

植物品种自身的抗病性与苯丙氨酸的代谢途径有密切关系。植物受病原菌侵染后, 抗病品种的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)活性提高比感病品种提高的幅度大, 并能迅速合成与抗病有关的生物物质, 如生物碱、植物保卫素、木质素等, 有效地阻止了病原菌的扩展, 因而PAL的活性测定可作为鉴别植物抗病性的生化指标之一^[1-4]。有研究表明, PAL活性与水稻品种的抗稻瘟病性^[5]、与低浓度玉米小斑病菌C小种毒素(HMC毒素)的诱导玉米抗病性^[6,8]、与抗马铃薯晚疫病^[9]以及与番茄叶霉病抗性^[10]等均呈正相关。

目前已知的诱抗剂可分为生物来源和非生物来源2大类。生物来源的诱抗剂包括真菌、细菌、病毒等; 非生物来源的诱抗剂包括由物理因子, 如机械损害、电磁、射线和高温、低温、湿度等处理以及许多化学因子诱导植物产生的抗病反应物质^[1-2]。生物激发子是指植物在防御过程中为抵抗微生物感染而产生的物质, 主要包括分生孢子、降解细胞壁的酶类、有机体的细胞壁碎片、有机体产生的代谢物以及培

养物滤液中的成分^[11-12]。

笔者用系列低浓度玉米小斑病菌 T小种毒素(HMT毒素)以及从毒素液中提取的蛋白质液与玉米小斑病菌 T小种菌丝细胞壁的提取液作为生物激发子, 分别处理玉米叶片并测定其相关PAL活性, 旨在探讨激发子与玉米抗病性的关系, 为玉米抗病机理的研究提供科学依据。

材料与方法

供试材料

玉米: C103的T型不育细胞质(CMS-TC103)及其同核保持系NC103, Mo17的T型不育细胞质(CMS-TMo17)及其同核保持系NMo17, B37的T型不育细胞质(CMS-TB37)及其同核保持系NB37, 均由河北省农林科学院遗传生理研究所提供。

菌株: 玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*) T小种(HMT), 由笔者所在实验室保存。

纯化毒素的制备

将玉米小斑病菌 T小种接种在 Fries 培养液

收稿日期: 2009-04-27; 修回日期: 2009-11-17

* 科技部国际科技合作项目(2006DFB02480)、农业部948项目(2008-Z20)、河北省自然科学基金项目(C2006000744)和河北省科学技术研究与发展计划项目(07297162D)资助

** 通讯作者. E-mail: Jiays2005@163.com

马春红, 女, 1968年生, 研究员. 研究方向: 植物抗逆生理与生物防治. E-mail: mchdonger@sohu.com

中, 25 ℃ 恒温黑暗静止培养 15 d。过滤获得毒素滤液, 将滤液与等体积的氯仿混合, 充分摇匀后静置分层, 然后用分液漏斗收取氯仿相, 并在 30~40 ℃ 条件下用真空旋转蒸发器蒸干, 获得褐色粘稠油状物(毒素粗品)。

将毒素粗品过硅胶柱层析, 用氯仿-甲醇梯度洗脱(V/V , 氯仿-甲醇 = 10:1, 9:1, 4.5:1, 3:1), 分部收集, 将活性最高的收集液混在一起, 重新蒸干, 获得纯化毒素。然后用少许甲醇溶解, 并用蒸馏水稀释配制成质量浓度梯度 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时, 在蒸馏水中加入与上述毒素溶液等量的甲醇作为对照。

毒素致病性的检测

采用离体叶片法观察玉米叶片的病斑反应。剪取 5 叶期幼苗的第 4 叶片, 在离叶缘 3 mm 处针刺, 每穴刺 3 个针眼, 穴距 1 mm, 取 T 毒素液 0.04 mL 滴于小棉球上, 然后依次置于各穴上, 恒温 25 ℃ 保湿培养 24 h, 观察毒素的致病情况, 即病斑形成过程^[13]。

毒素培养滤液中蛋白的提取

将玉米小斑病菌 T 小种接种到 Fries 培养液并培养 15 d 后, 参照张正光等的方法获得无菌滤液^[14]。向滤液中缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至质量分数为 70%, 置于 4 ℃ 过夜后, 在 4 ℃, 12 000 r/min 的条件下离心 20 min, 收集沉淀, 并重悬于 25 mL 的 10 mmol/L Tris · HCl (pH 7.4) 中, 获得 HMT 毒素的胞外粗蛋白液。

病菌菌丝细胞壁粗提液的提取

将玉米小斑病菌 T 小种接种于 Fries 培养液中, 25 ℃ 培养 15~20 d 后用纱布和滤纸过滤, 获得菌丝, 并用双蒸水冲洗菌丝 2 次, 使其浓度相当于原 Fries 培养液。再用超声波粉碎机破碎 15 min, 其间每隔 30 s 停 15 s, 整个过程在冰浴中进行。镜检菌体应破碎完全为宜, 然后在 4 ℃, 3 000 r/min 的条件下离心 5 min, 除去破碎的细胞和杂质。上清采用 4 ℃, 17 000 r/min 离心 30 min 获得粗细胞壁提取液。将提取液按比例(V/V) 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 稀释备用。

毒素的预处理

分别将质量浓度为 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HMT 毒素预处理 4 叶 1 心期的玉米第 3 叶片, 即将不同浓度的稀释液用毛笔刷分别涂抹在玉米叶背面, 每

24 h 涂抹 1 次, 连续涂 2 d 后分别把相应处理的同位置叶片剪为大小一致的 3 段, 并置于铺有湿滤纸 (12 cm \times 12 cm) 的培养皿内。2 d 后再以离体叶片法, 叶片正面向上, 针刺 3 处, 每穴 3 个点, 接种高致病浓度的 HMT 毒素 (1:20) 72 h, 每穴接种量为 20 μL , 放置在 27 ℃、光照 12 h 的人工气候培养箱内培养 5 d, 用蒸馏水作对照, 观察并记录。分别测定接种 24 h、48 h、72 h、96 h 后叶片内抗性相关酶的变化。

毒素蛋白液和菌丝细胞壁粗提液的提取

将 HMT 毒素培养滤液中的胞外粗蛋白液按 1:2、1:4、1:8、1:320、1:360、1:400 的比例 (V/V) 稀释, 将菌丝细胞壁粗提液按 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 的比例 (V/V) 稀释, 然后分别使用不同稀释倍数的溶液处理 4 叶期玉米第 3 叶片。用蒸馏水作对照。具体操作步骤按本文“1.6”中的方法进行。

苯丙氨酸解氨酶()活性的测定

称取玉米叶片 0.15 g, 用液氮研磨, 然后加 5 mL 硼酸缓冲液 (pH 6.5) (内含 5 mmol/L 的巯基乙醇, 4% PVP) 匀浆后。在 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清获得酶粗提液。取 1 mL 的酶液加入 1 mL 0.02 mol/L 的 L-苯丙氨酸和 2 mL 蒸馏水, 在 30 ℃ 恒温水浴中反应 0.5 h 后, 用 752 分光光度计测定 290 nm 处吸光度, 以每小时吸光度变化 0.01 OD 值所需的酶量为 1 个单位 (U)^[13]。

结果与分析

毒素诱导处理玉米叶片的病斑反应

经质量浓度为 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HMT 毒素预处理 TC103 叶片的病斑面积为 $(9.0 \pm 2.0) \sim (20.0 \pm 3.0) \text{mm}^2$; 而未经预处理的对照叶片病斑面积为 $(64.0 \pm 2.0) \text{mm}^2$ 。经 t 检验, 各处理与对照比差异达极显著水平 ($P < 0.01$), 说明 TC103 叶片经低浓度毒素预处理后可以显著提高对高浓度毒素的抗性。在另一组试验中, 经过预处理的 NC103 玉米叶片, 与对照比较病斑大小无显著差异 ($P > 0.05$)。此外, 经预处理后的 TC103 叶片的病斑面积略小于未经预处理的、自身高抗小斑病菌的 NC103。

经低浓度 HMT 毒素预处理的 CMS-TM₀17 和 CMS-TB37 叶片病斑面积分别为 $(13.0 \pm 4.0) \text{mm}^2$ 和 $(17.0 \pm 4.0) \text{mm}^2$, 对照处理的病斑面积分别为

(65.0 ± 2.6) mm²和(68.0 ± 3.0) mm²;各处理与相应对照比较,差异均达到极显著水平($P < 0.01$)。对于 NMo17 和 NB37 而言,经预处理的各叶片和对照之间差异不显著($P > 0.05$)。

病菌蛋白提取液对玉米抗病性的影响

经玉米小斑病菌 T 小种培养滤液中提取的蛋白质液稀释后预处理的 TC103 叶片病斑面积为(89.0 ± 6.0) mm²,而对照为(64.0 ± 2.0) mm²。表明玉米小斑病菌 T 小种培养滤液中的蛋白不能作为激发子来提高玉米诱导抗病性。

病菌细胞壁提取液对玉米抗病性的影响

经稀释的玉米小斑病菌 T 小种菌丝细胞壁提取液预处理的玉米叶片病斑面积为(118.0 ± 10.0) mm²,与对照玉米病斑面积(64.0 ± 2.0) mm²比较并未减小。这说明 T 小种菌丝细胞壁的提取液也不是 T 小种培养滤液中能作为激发子的组分。

活性的测定

经不同质量浓度 0.001 μg/mL、0.005 μg/mL、0.025 μg/mL、0.050 μg/mL HMT 毒素预处理后再接较高浓度毒素处理,在 0~96 h 内,TC103 玉米叶片中 PAL 的活性均高于未经低浓度毒素预处理的对照(图 1)。其中经质量浓度 0.025 μg/mL 毒素预处理的效果最好,PAL 活性提高幅度最大,0 h 比对照提高了 19.7%,24 h 比对照提高了 68.9%,96 h 比对照提高了 52.1%。这说明低浓度 HMT 毒素预处理可以提高 PAL 活性。

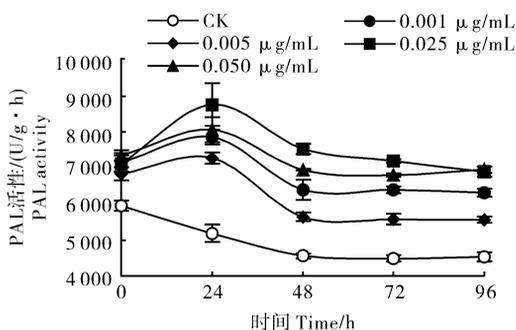


图 1 HMT 毒素处理 TC103 细胞质玉米叶片 PAL 活性的变化

Fig. 1 Fluctuation of PAL activity influenced by HMT toxin pretreatment in variety TC103 of maize

低浓度 HMT 毒素预处理 NC103 玉米叶片后, PAL 活性有所提高,但是不如 TC103 玉米叶片明显(图 2)。

试验结果表明,在预处理 0~96 h,经低浓度 HMT-T 毒素预处理的 CMS-TMo17 玉米叶片,其

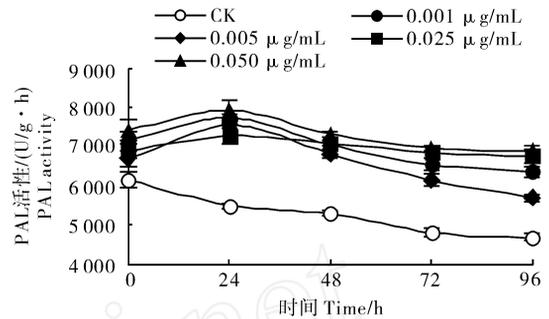


图 2 HMT 毒素处理 NC103 细胞质玉米叶片 PAL 活性的变化

Fig. 2 Fluctuation of PAL activity influenced by HMT toxin pretreatment in variety NC103 of maize

PAL 活性均高于未经预处理的对照(图 3)。除了 0.001 μg/mL 预处理的玉米叶片在 48 h 时 PAL 活性达到高峰外,其它 3 种处理均在 24 h 时 PAL 活性达到最高峰,随后保持平稳。

试验结果还表明,0.050 μg/mL HMT-T 毒素预处理的效果最好,PAL 活性提高幅度最大,其活性在 0 h、48 h、96 h 时比对照处理分别提高了 35.5%、87.7%和 102.5%。

经不同低浓度 HMT-T 毒素预处理的 CMS-TB37 玉米叶片的 PAL 活性变化比较平稳,没有出现明显的峰值,在 0~96 h, PAL 活性一直高于对照,其活性始终保持在一定水平,且在接高浓度 HMT-T 毒素后,也未呈现明显下降趋势(图 4)。

试验结果还表明,0.025 μg/mL HMT-T 毒素预处理效果最好, PAL 活性在 0 h 为 6460 U/(g·h),对照为 6522 U/(g·h); 24 h 为 7115 U/(g·h),较对照提高了 24.6%; 48 h 为 6946 U/(g·h),较对照提高了 90.6%; 96 h 为 6493 U/(g·h),较对照提高了 161.9%。0~96 h 内, PAL 活性较对照平均提高了 83.2%。

经预处理的 TB37 玉米叶片 PAL 活性虽没有大幅度提高,但低浓度 HMT-T 毒素显著缓和了叶片中 PAL 活性下降的趋势。用低浓度 HMT-T 毒素预处理 CMS-TMo17 和 CMS-TB37 叶片,同样可以提高玉米叶片中的 PAL 活性。

另外,采用相同的方式处理 NMo17 玉米叶片,其 PAL 活性也有所提高,但不如在 TB37 叶片中显著,其 PAL 的活性变化在 0~96 h 时一直比较平稳(图 5)。NB37 叶片中 PAL 活性也只是保持在一定水平上,没有下降的趋势(图 6)。

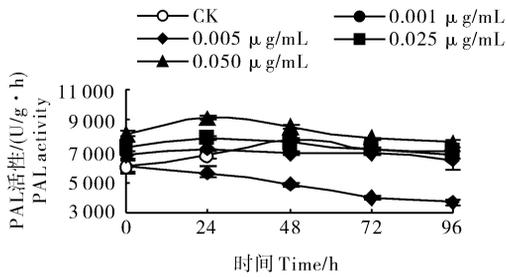


图 3 HMT 毒素处理 TM017 不育细胞质玉米叶片 PAL 活性的变化

Fig. 3 Fluctuation of PAL activity influenced by HMT-toxin pretreatment in leaves of CMS-TM017 line of maize

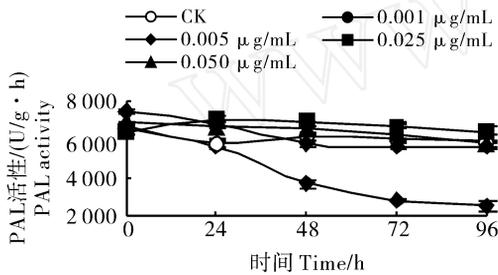


图 5 HMT 毒素处理 NM017 细胞质玉米叶片 PAL 活性的变化

Fig. 5 Fluctuation of PAL activity influenced by HMT-toxin pretreatment in leaves of NM017 line of maize

讨论

激发子 (elicitor) 是植物抗病生理过程中诱发植物产生植物抗毒素和引起植物过敏反应 (hypersensitive reaction, 亦称抗性反应或自身防御反应 self-defense reaction) 的因子, 包括侵染植物的微生物及植物细胞内的分子都可能具有激发子的作用。激发子在植物与微生物的相互作用中, 能快速、高度专一性地诱导特定基因的表达。

HMT 毒素是一种线性多聚酮类 (linear polyketol), 主要破坏 CMS 玉米细胞质中线粒体膜的完整结构和正常功能, 但是有关 HMT 毒素是否可以作为激发子来诱导玉米的抗病性, 以前的研究较少。本试验采用 HMT 毒素滤液和从滤液中提取的蛋白质液分别预处理玉米叶片后, 在以玉米叶片对小斑病菌的抗性鉴定作为宏观依据的基础上, 测定了与植物抗病性密切相关的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的生理指标, 结果表明植株体内 PAL 的活性增高, 同时观察到植株对病害的抗性大幅度提高。但最终证明只有 HMT 毒素本身能够作为激发子提高玉米叶片的抗病性。

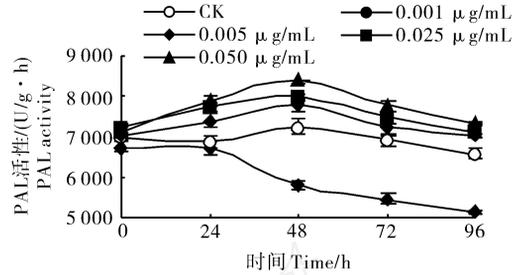


图 4 HMT 毒素处理 TB37 不育细胞质玉米叶片 PAL 活性的变化

Fig. 4 Fluctuation of PAL activity influenced by HMT-toxin pretreatment in leaves of CMS-TB37 line of maize

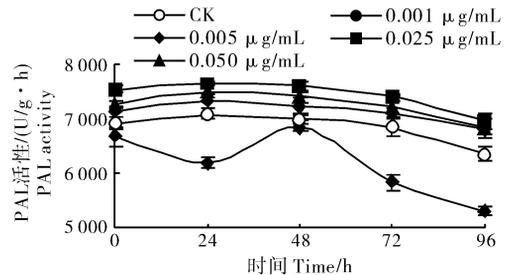


图 6 HMT 毒素处理 NB37 细胞质玉米叶片 PAL 活性的变化

Fig. 6 Fluctuation of PAL activity influenced by HMT-toxin pretreatment in leaves of NB37 line of maize

低浓度玉米小斑病菌 T 毒素诱导抗病性作用具有一定的广谱性, 其依据就是它不仅能显著提高 TC103 叶片的 PAL 活性, 而且对其它基因型玉米的 T 细胞质 (TM017、TB37) 也产生类似的作用。此外, 不同玉米品系中所需激发子的最适宜浓度有差异, TC103 以 $0.025 \mu\text{g}/\text{mL}$ 处理效果最好, PAL 活性最高, 达到 $8765 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{h})$; TM017 以 $0.050 \mu\text{g}/\text{mL}$ 处理效果最好, PAL 活性最高, 达到 $9141 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{h})$; TB37 以 $0.025 \mu\text{g}/\text{mL}$ 处理效果最好, PAL 活性最高, 达到 $7115 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。

参考文献

- [1] 董汉松. 植物诱导抗病性原理和研究[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 9-223.
- [2] 李冠, 薛应龙, 欧阳光察. 诱导免疫哈密瓜植株的苯丙烷类代谢酶活力及新蛋白质的出现[J]. 植物生理学报, 1989, 15(4): 360-364.
- [3] 翟彩霞, 马春红, 秦君, 等. 植物诱导抗病性的常规鉴定——相关酶活性变化与诱导抗病性的关系[J]. 中国农学通报, 2004, 20(5): 222-224.
- [4] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究. 玉米小斑病菌 *Helminthosporium maydis* T 小种和大斑病菌 *Helminthosporium turcicum* 毒素对苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的刺激

- 作用[J]. 植物生理学报, 1982, 8(3): 237-244.
- [5] 李静波, 柏连阳, 任新国, 等. 诱抗剂及诱导对水稻稻瘟病抗性的机理研究进展[J]. 中国植保导刊, 2008, 28(1): 15-18.
- [6] 商闯, 马春红, 李运朝, 等. 玉米小斑病菌 C 毒素培养滤液对玉米叶片苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的诱导效应[J]. 玉米科学, 2008, 16(2): 131-134.
- [7] 商闯, 马春红, 贾银锁, 等. 低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液诱导寄主抗性的研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 198-204.
- [8] MA C H, SHANG C, JIA Y S, et al. Induced resistance to southern leaf spot disease of maize by low concentration filtrate of HMC toxin cultivation [J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(5): 590-596.
- [9] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫病中的作用[J]. 植物生理与分子生物学报, 1982, 8(1): 35-42.
- [10] 崔彦玲, 张环. 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相关性[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 79-82.
- [11] 商闯, 贾银锁, 马春红, 等. HMC 毒素培养滤液对专化寄主玉米叶片诱导抗病性及相关酶的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4307-4313.
- [12] 翟彩霞, 马春红, 陈霞, 等. 抗病激子在诱导植物抗病性中的应用[J]. 华北农学报, 2003, 18(增刊): 58-61.
- [13] MA C H, ZHAI C X, WANG L A, et al. Induced resistance by the toxin filtrate of *Bipolaris maydis* Race T cultivation [J]. Agricultural Sciences in China (中国农业科学英文版), 2006, 5(9): 678-684.
- [14] 张正光, 王源超, 郑小波. 棉疫病菌 90 kD 胞外蛋白激酶子生物活性与稳定性研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 213-218.

Effect of Inducement by HMT-T Toxin to PAL Activity in Maize Leaves

MA Chun-hong¹ ZHAI Cai-xia² ZHENG Qiu-ling³

DONG Wen-qi⁴ LI Yun-chao¹ CUI Si-ping¹ FAN Wei-wei⁵ JIA Yin-suo¹

1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;
2. Institute of Resources and Environment, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;
3. Institute of Coastal Agriculture, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Tanghai 063200, China;
4. Department of Science and Technology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;
5. Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050011, China

Abstract The maize leaves were pretreated respectively by low concentration *Helminthosporium maydis* T-toxin (HMT-T), protein and cell-wall, which were extracted from cultivating filtrate at the stage of three-leaf, and then these leaves were treated by high concentration HMT-T and cultivated 5 d. The dimension of spots in infected leaves was calculated and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity determined. The result showed that only the HMT-T could act as elicitor in the cultivating filtrate. The suitable concentration of HMT-T was different for various varieties. As to TC103 the suitable concentration of toxin was 0.025 µg/mL and the PAL activity of maize leaves reached its maximum degree in this case. The right concentration of TB37 and TMO17 were 0.025 µg/mL and 0.050 µg/mL respectively.

Key words *Helminthosporium maydis* T (HMT); toxin; elicitor; phenylalanine ammonia lyase (PAL)

(责任编辑:陈红叶)