

小麦抗条锈新品系 89144 抗锈机理研究

倪建福¹, 欧巧明¹, 令利军¹, 叶春雷¹, 王亚馥²,
邢更妹², 李 杉², 崔凯荣², 武禄光³

(1. 甘肃省农业科学院生物技术中心, 兰州 730070; 2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000;
3. 澳大利亚昆士兰大学生命学院, 昆士兰)

摘要 将高粱总 DNA 通过花粉管通道导入小麦感病品种甘麦 8 号, D₂ 代出现 2 株对条锈病免疫的变异株, D₅ 代有 9 个株系抗性已经稳定; 用混合菌和分小种鉴定, 对条中 29、30、洛 13 II、水 14、水 14 中梁 17-s、HY3、条中 31 号等小种表现免疫。结果分析表明, 新品系 89144 接种后组织中 SOD 活性升高, 原受体甘麦 8 号接种锈菌后 SA 含量也有升高; 但并不伴随有 CAT 活性下降, SOD 活性和 H₂O₂ 含量的升高; 推测 SA 为 CAT 过氧化活性提供一个电子的过程中 SA 含量必须达到一定的阈值, 并且与 CAT 的时序调节相配合; 据 SA 结合态和游离态含量的变化动态, 表明 89144 具有 SA 信号传导途径, 推测 SA 信号传导途径的上游应该还有一些机制在起作用。

关键词 植物病理学; 小麦条锈病; 抗锈新品系

中图分类号 S 435.121.42

A study on the rust-resistant mechanisms of a new rust-resistant spring wheat strain 89144

Ni Jianfu¹, Ou Qiaoming¹, Ling Lijun¹, Ye Chunlei¹, Wang Yafu²,
Xing Gengmei², Li Shan², Cui Kairong², Wu Luguang³

(1. Biotechnology Center, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

2. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

3. School of Life Sciences, University of Queensland, Australia)

Abstract The exogenous DNA of sorghum was introduced into the rust-sensitive wheat breeding Ganmai 8 by the pollen tube passage. Two rust resistant variants appeared in the first generation (D₂), 9 lines of which were stable in resistance in the D₅ progeny. The resistance of the variant plants to yellow rust (*Puccinia Striiformis*) was identified by inoculating mixed races with different virulence at adult stage and inoculating physiological races of yellow rust at seedling stage. The results indicated that the variant plants were immune to stripe rust Tiaozhong29, Tiaozhong30, Luo13II, Shui14Zhongliang17-s, HY3 and Tiaozhong31. In strain 89144, the increase in SA content was accompanied by the decrease in CAT activity and increase in H₂O₂ content and SOD activity. But in Ganmai 8, the increase in SA content was not accompanied by the above changes observed in 89144, after inoculation of *Puccinia striiformis* f. sp. Tritici. It was deduced that only when the content of SA reached a certain level, it could coordinate with CAT. According to the dynamic changes in the content of free and combined SA, it was concluded that other regulation mechanisms might exist in the upstream of the signal transduction pathway. Meanwhile, SA signal transduction pathway might also exist in Spring Wheat Strain 89144.

Key words phytopathology; wheat stripe rust disease; new rust-resistant spring wheat strains

小麦条锈病(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)是甘肃省小麦主要病害之一,严重影响小麦高产稳产。国内外研究和生产实践证明,选育抗锈病品种是防治该病最经济有效的途径^[1]。为了培育新的

抗锈品种,从 1988 年起,在总结以往工作的基础上开展了应用花粉管通道法将外源 C₄ 作物高粱 DNA 向小麦转移的探索,1989 年在大田和温室共做了 80 个外源 DNA 导入组合,获得抗条锈病新品系

89144,并对其后代材料作了较系统的观察和研究。本文报道小麦抗条锈新品系主要特征和抗性生理生化变化进行比较测定和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

受体为普通小麦(*Triticum aestivum*),品种甘麦8号,株高107 cm左右,穗型棍棒状、顶芒、生育期104 d,适应性强,曾大面积种植,现重感条锈病;供体为高粱[*Sorghum bicolor* (L.)],品种米高粱,抗旱、耐涝、耐盐碱、适应性强。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取和导入

供体高粱DNA提取和导入参照倪建福等方法^[2]。

1.2.2 田间资料统计与观察

经处理的当代受体记作D₀,其后代依次记为D₁、D₂和D₃等。D₀~D₁按组合收种子,以后按系谱法选择,等抗性稳定后再按组合收种子,种植按行长1.20 m、行距0.20 m、粒距0.04 m点播,田间观察和室内外考种项目按常规育种要求进行,各种材料按种植小区和株系收获。

1.2.3 抗锈性鉴定

除本中心每年用心叶涂抹法接种流行混合菌选择外,对获得的抗锈新品系再送甘肃省农业科学院植保所进行专门鉴定,反应型按常规标准记载。

1.2.4 种子粗蛋白和淀粉含量的测定

抗锈新品系89144和供、受体一并送测试中心,按照国家规定的标准方法测定。粗蛋白是将材料先采用凯氏法处理后,用瑞典Tecator公司的Kjeltea system II氮/蛋白质分析仪测定;赖氨酸采用国际染料结合法(PBL法)染色,再用北京环保仪器厂的GXDL-202型蛋白质赖氨酸分析仪测定;淀粉采用国际旋光法测定^[3]。

1.2.5 水杨酸(psalicylic acid, SA)含量的测定

将小麦种子浸种后,播种于塑料钵蛭石内,在小麦一叶展叶时利用心叶涂抹法接入小麦条锈菌混合菌种,培养温度13~19℃,光照12 h/d,湿度100%,接种后24、32、40、48、56 h取材。参考李兆亮等方法^[4]用硅胶板纯化粗提液,用HPLC(仪器型号Waters™600E C-18柱)检测样品中SA含量,检测温度40℃,流速为0.6 mL/min,检测波长310 nm,保留时间4.05 min。

1.2.6 过氧化氢酶(CAT)活性的测定

取0.5 g叶片加1.8 mL预冷的提取缓冲液

(10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.25 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 10.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF),研磨成匀浆后在4℃条件下27 000 g离心15 min,上清液按崔凯荣方法测定酶活性^[5]。

1.2.7 过氧化氢(H₂O₂)含量的测定

取1 g叶片参考Patterson等方法加3 mL冷丙酮磨成匀浆,16 000 g离心10 min,上清液定容,反应液中含0.1 mL体积分数20% TiCl₄的浓盐酸,0.2 mL浓氨水和1 mL上清液。生成的过氧化物-Ti复合物用丙酮洗5次,丙酮挥发后溶于3 mL硫酸(1 mol/L)中,测410 nm光吸收值,制作H₂O₂标准曲线^[6]。

1.2.8 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

取0.5 g叶片加1.8 mL预冷的提取缓冲液(50 mmol/L pH7.8磷酸缓冲液,0.1 mmol/L EDTA,体积质量0.3% Triton X-100;体积质量4%聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)研磨后用纱布过滤,10 500 g离心20 min,上清液为粗酶液。按照EL-moshaty等方法测定SOD活性,根据SOD抑制NBT光化学还原的量计算酶活性^[7]。

1.2.9 过氧化物酶(POD)活性的测定

取0.5 g叶片参考崔凯荣等方法加1.8 mL预冷的提取缓冲液(100 mmol/L PBS, pH6.0,内含体积分数0.1% Triton X-100和体积质量0.04%偏重亚硫酸钠。冰浴研磨,14 000 g离心15 min。以愈创木酚作底物,在470 nm处测OD值,以△OD/min·mg蛋白为酶活单位。

2 结果与分析

2.1 生物学特性

1989年将高粱DNA通过花粉管通道导入小麦感病品种甘麦8号,共处理小花或子房134个,获得D₀代种子28粒,结实率为20.90%。1990年点播成苗27株;1991年种植900株,从中选出2株变异株;1992年从中选1株种子点播;1993年种植1 800株,获得变异株121株;1994年种植1 140株,入选41株;1995年种植1 800株,从中选出稳定遗传的抗锈新品系89144系列,其生物学特性,见表1。

两个抗锈新品系的大多数生物学性状是介于受体和供体之间,如叶功能期延长,株高降低,穗长和粗蛋白增加以及千粒重、赖氨酸和淀粉含量等均介于供体和受体之间,但籽粒饱满度增加,小穗排列疏松,叶片变窄变长,颖壳变硬(表2)。

表 1 抗锈新品系 89144 系列与相应供体、受体的生物学特性

材料	生育期/d	株高/cm	穗长/cm	穗粒重/g	千粒重/g	粗蛋白/%	赖氨酸/%	淀粉/%
89144-2-3-11-6	99	97.0	12.0	1.4	33.2	13.57	0.48	63.08
89144-2-14-4-1-4	99	98.8	12.6	1.0	32.8	13.68	0.47	64.01
米高粱	132	171.8	23.0	53.3	24.8	12.70	0.29	64.07
甘麦 8 号	96	107.2	9.6	2.3	39.8	12.83	0.48	63.81

表 2 抗锈新品系 89144 系列抗条锈性鉴定¹⁾

材料	苗期				成株期			
	混合菌	条中 29	洛 13Ⅲ	水 14	水 14 中梁 17-s	HY3	条中 31	混合菌
89144-2-3-11-6	0	0	0	0	0	0	0	0
89144-2-14-4-1-4	0	0	0	0	0	0	0	0
甘麦 8 号	3/25/80	3/5/30	3/40/20	3/5/10	3/25/80	3/25/50	3/40/100	3/50/80

1) 条锈病记载标准采用 0~6 级分类法; 0 代表免疫, 反应型/严重度/普遍率。

抗锈性鉴定结果表明, 两个抗锈新品系 89144 对目前流行的所有小种免疫, 特别是在近年甘肃生产上应用的所有小麦品系几乎对条中 31 和 32 号丧失抗性的情况下, 89144 仍然抗锈, 与其杂交的组合后代也非常抗锈, 见表 2。

2.2 水杨酸含量变化

在接种条锈菌后, 通过 HPLC 测定结合态与游离态 SA 含量变化结果如图 1、2。抗锈新品系 89144 游离态水杨酸从 32 h 开始逐渐升高, 40 h 达到峰值, 然后开始缓慢下降, 到 48 h 急剧下降。甘麦 8 号从 24 h 开始缓慢上升, 上升幅度比 89144 小 2 倍, 到 32 h 快速下降, 而在未接种锈菌的对照中, 89144 和甘麦 8 号内源游离 SA 含量变化都不大。图 2 表明, 接种后 89144、甘麦 8 号的结合态 SA 含量都有上升, 并且甘麦 8 号比 89144 上升幅度大而且时间早。在对照中, 89144、甘麦 8 号的结合态 SA 含量变化不大。

2.3 过氧化氢酶活性变化

由图 3 可以看出, 抗锈新品系 89144 的 CAT 活性在接种条锈菌 40 h 处开始大幅度下降, 48 h 后又略有回升, 而甘麦 8 号变化不大。对照未接种条锈菌的 89144、甘麦 8 号, CAT 活性变化不大。

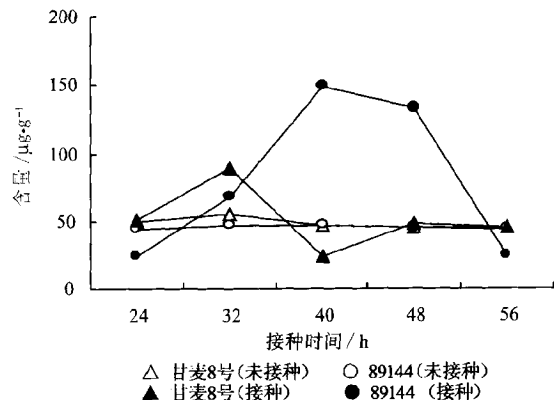


图 1 游离态水杨酸(SA)含量的变化

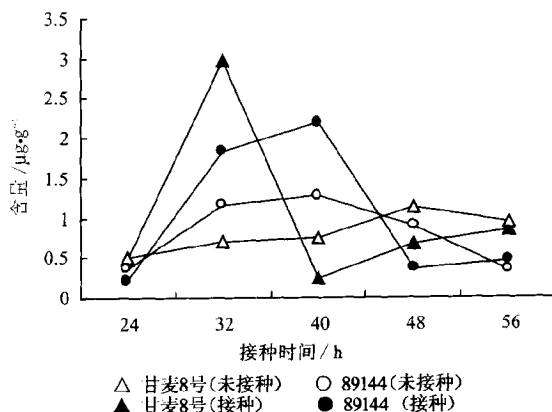


图 2 结合态水杨酸(SA)含量变化

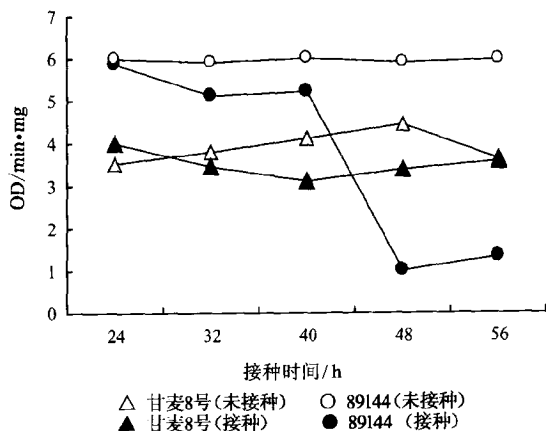


图 3 过氧化氢酶(CAT)活性变化

2.4 过氧化氢含量变化

图 4 表明, 在接种锈菌 48 h 后, 抗锈新品系 89144 中 H_2O_2 含量达到峰值, 甘麦 8 号含量也略有升高, 而对照 89144、甘麦 8 号 H_2O_2 含量变化不大。

2.5 超氧化物歧化酶活性变化

图 5 表明, 抗锈新品系 89144 在接种后 40 h, SOD

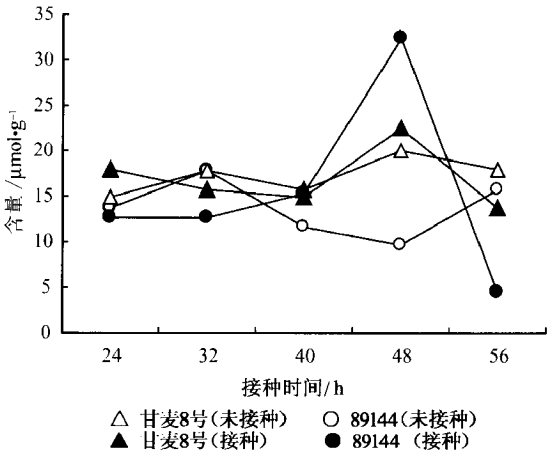


图 4 过氧化氢(H₂O₂)含量的变化

活性开始增高,到 48 h 达到峰值,而后迅速下降。甘麦 8 号接种后 32 h 开始缓慢增高,但增高幅度不大。而在对照 89144 和甘麦 8 号的 SOD 酶活性变化都不明显。

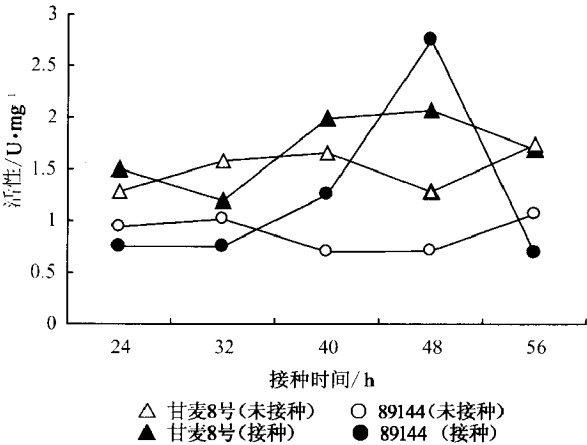


图 5 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

2.6 过氧化物酶活性变化

图 6 中抗锈新品系 POD 酶活性无论在接种条件下还是在未接种条件下变化都不大,只是在接种 56 h 后抗锈新品系 89144 的 POD 活性稍有升高。

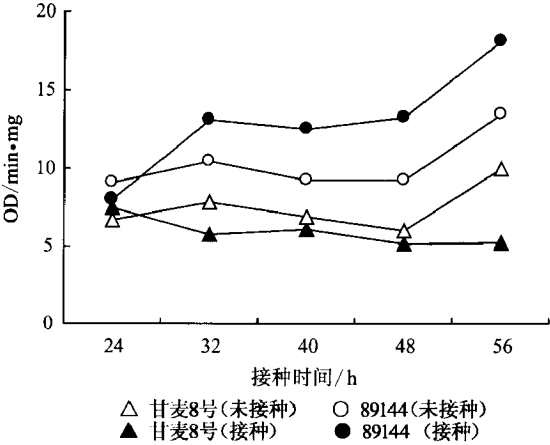


图 6 过氧化物酶(POD)活性变化

3 讨论

经多年实践表明,利用花粉管通道将外源 DNA 导入小麦胚囊,转化上不具备正常细胞壁即合子或早期细胞是完全可行的^[8-9],因为 DNA 片断与受体基因组部分基因间有可能存在同源性而发生杂交重组^[2]。该技术之所以提高选育出抗锈品系的成功率,是因为供体一方的染色体经提取后片断变小,从而减少了整条染色体之间的排斥性,增加了部分染色体重组几率。

实验研究显示,外源 DNA 导入后代抗锈新品系 89144 在接种锈菌 40 h 后,内源游离 SA 含量达到峰值,从 40 h 至 48 h 有一个缓慢下降阶段,同时伴随着 CAT 活性降低, H₂O₂ 含量增加, SOD 活性增高。而不抗锈品种甘麦 8 号在接种锈菌后,也有内源游离 SA 含量升高,但并不伴随有 CAT 活性下降和 SOD、POD 活性升高,也没有 H₂O₂ 含量的上升。Chen 等曾研究证明烟草中的 SA 结合蛋白 (SA-binding protein, SABP) 具有 CAT 活性,可以降解 H₂O₂ 产生 O₂ 和 H₂O, SA 阻遏 SABP 的 CAT 活性, SA 作为电子供体为 CAT 的过氧化活性提供一个电子,同时抑制并使这些酶处于不活跃状态,从而导致 H₂O₂ 含量升高^[10-13]。从本实验结果可以看出虽然抗锈新品系 89144 和甘麦 8 号接种锈菌后, SA 含量都有升高,但甘麦 8 号 H₂O₂ 含量达到峰值的时间早,峰值低,这可能是因为 SA 为 CAT 过氧化活性提供一个电子的过程中 SA 的量必须达到一定的阈值,并且与 CAT 的时序调节相配合。

实验中还发现,甘麦 8 号、抗锈新品系 89144 接种锈菌后游离 SA 含量增高,结合态 SA 含量也升高,所以在诱导条件下游离 SA 含量的升高不一定来自于结合态 SA 的释放,还可能是植物体内与 SA 合成的相关基因被启动。这样,在 SA 信号传导途径的上游就还有某些机制在起作用。抗锈新品系 89144 接种锈菌后 SOD 活性也有升高, SOD 可使 O₂⁻ 通过歧化反应产生 H₂O₂, 在正常条件下,植物体中的 SOD 活性足以清除体内的 O₂⁻, 使 O₂⁻ 保持在正常生理水平。但在逆境条件下, O₂⁻ 水平的提高刺激了 SOD 活性的增加,这可能与病原物诱导的氧化喷发有关。但在实验中并没有发现 POD 活性的大幅度变化,也许在检测时 POD 活性已恢复常态,这也符合氧化喷发的时相。由此推测在植物体内 H₂O₂ 含量升高可以通过多种途径造成, Chen 等的实验也证明 H₂O₂ 或它的衍生物活性氧可激活抗

病反应途径中相关基因表达。

参考文献

- [1] 曹张军,井金学,王美南,等. 小麦品种贵农 22 号抗条锈病基因遗传分析[J]. 西北植物学报, 2004, 24(6): 991 - 996.
- [2] 倪建福,周文麟,王亚馥,等. 偃麦草导入小麦的研究[M]// 周光宇,陈善葆,黄俊麒,等. 农业分子育种研究进展. 北京: 中国农业科学出版社, 1993: 76 - 80.
- [3] 倪建福,周文麟,王亚馥. 高粱 DNA 导入小麦选育出抗条锈白粒新品系[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1994, 30(增刊): 144 - 147.
- [4] 李兆亮,原永兵,李冬梅. 薄层层析和高效液相层析技术结合测定植物叶片水杨酸含量[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(2): 130 - 132.
- [5] CUI K R, XING G S, LIU X M, et al. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L[J]. Plant Science. 1999, 146: 9 - 16.
- [6] PATTERSON B D, MACKAE E A, FERGUSEN I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV)[J]. Annal Biochem, 1984, 139: 487 - 492.
- [7] EL-MOSHATY F I, PIKE S M, NOVACKY A J, et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus[J]. Physiol Amol Plant Pathol, 1997, 43: 109 - 119.
- [8] 周光宇,黄俊麒,翁 坚,等. 农业分子育种, 授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学, 1998, 21(3): 1 - 6.
- [9] 周光宇. 植物基因工程与分子育种[J]. 生物科学信息, 1989, 1(1): 7 - 11.
- [10] CHEN Z, KLESSING D F. Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in the signal transduction in the plant disease resistance response[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8179 - 8183.
- [11] CHEN Z, SALIVA H, KLESSIG D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid[J]. Science, 1993, 262: 1883 - 1886.
- [12] CHEN Z, RICIGLIANO J W, KLESSIG D F. Purification and characterization of soluble salicylic acid-binding protein from tobacco[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 9533 - 9537.
- [13] DURNER J, KLESSIG D F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalase[J]. Biol Chem, 1996, 27: 28492 - 28501.