

向日葵与锈菌互作过程中活性氧的积累

景 岚^{1,2} 王丽芳² 康 俊² 韩青梅^{1*} 康振生^{1*}

(1. 西北农林科技大学, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100;

2. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019)

摘要: 为了探讨向日葵品种与锈菌互作中活性氧的产生和积累与向日葵抗锈病性的关系, 采用分光光度计法及联苯胺蓝(DAB)、氮兰四唑(NBT)染色法对过氧化氢(H_2O_2)及超氧阴离子自由基(O_2^-)诱导积累的过程进行了检测。结果表明: 接种后抗、感病品种均出现 H_2O_2 和 O_2^- 双峰, 侵染早期积累明显, 最高峰出现在16 h, 在抗病品种中活性氧产生和积累明显高于感病品种; 在抗病品种中侵染位点活性氧的产生及积累较明显, 接种后16 h, 侵染位点周围的染色范围较大, 染色较深, H_2O_2 及 O_2^- 的染色比例均达到最高, 分别为65.5%和41%; 而在感病品种的侵染位点没有检测到明显的活性氧积累。

关键词: 向日葵; 锈菌; 活性氧; 抗性

The accumulation of active oxygens during the interactions of sunflower and rust fungus

Jing Lan^{1,2} Wang Lifang² Kang Jun² Han Qingmei^{1*} Kang Zhensheng^{1*}

(1. Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100,

Shaanxi Province, China; 2. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University,

Huhot 010019, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract: Our study analyzed the relationship between the different resistant sunflower varieties inoculated with *Puccinia helianthi* Schw. and the accumulation of active oxygen. H_2O_2 content and O_2^- production rate of different sunflower varieties were tested with spectrophotometers; detection of H_2O_2 and O_2^- were carried out using the 3,3-diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT). The results revealed that in susceptible and resistant varieties active oxygen presented the double peak trends, rapid increment of active oxygen was obvious at the early stage of infection, 16 hours after inoculation (hai), H_2O_2 and O_2^- reached to the highest peak; the accumulation of active oxygen in resistant varieties was significantly higher than that in the susceptible. It was observed by in situ stain that in resistant varieties, stain range was wide and deep. The percentage of infection sites showing NBT and DAB staining all reached the highest 65.5% and 41%, respectively, 16 h after inoculation (hai). But no obvious stain was observed in susceptible varieties, suggesting the positive correlation of the accumulation of H_2O_2 and O_2^- with the resistance level of sunflower to rust disease.

Key words: sunflower; *Puccinia helianthi*; active oxygen; resistance

基金项目: 陕西省农业分子生物学重点实验室开放基金(200702)

作者简介: 景岚, 女, 1971年生, 副教授, 研究方向为植物免疫学, email: jinglan71@126.com

* 通讯作者 (Authors for correspondence), email: hanqm@nwsuaf.edu.cn, kangzs@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2008-09-08

锈病是向日葵的重要病害,在世界各地普遍发生,严重影响向日葵的产量和含油量。向日葵锈病由向日葵柄锈菌 *Puccinia helianthi* Schw. 引起,该菌单主寄生,其中夏孢子可通过叶片气孔侵入。

抗病基因是植物-病原菌相互关系中的一个关键因子,是抗病机制研究的基础。目前,已从不同来源的向日葵谱系中鉴定出分别对不同锈菌小种具有抗性的多个基因^[1]。关于向日葵抗病性的生理生化机制, Mohase 等^[2]曾报道向日葵感染锈病后,抗病品种体内的病程相关蛋白、 β -1,3 葡聚糖酶、几丁质酶、苯丙氨酸解氨酶、水杨酸的活性均有所提高。

近来研究表明,活性氧(AOS)代谢与植物的抗病性有关,即 AOS 参与了植物与病原物互作体系中的许多关键过程,包括抗菌作用^[3]、细胞壁强化^[4]、植保素合成^[5,6]、抗病信号转导^[7,8]和过敏性细胞死亡^[9]等。

植物具有多重防御体系,植物的抗病防卫反应抵御病原菌的有效性取决于这些反应是否在特定的寄主部位以较早的时间达到较高的水平。本研究旨在通过对受锈菌侵染的向日葵叶片活性氧含量测定及原位活体染色,探讨向日葵抗病性与 H_2O_2 和 O_2^- 产生和积累的关系。

1 材料与方法

1.1 供试植物

高度感病品种:益民花葵 2 号;高度抗病品种: S₄₀ (Hyoleic40) 油葵。

1.2 供试病原菌

锈菌样本采自内蒙古向日葵锈病流行区,即乌拉特前旗和呼和浩特市郊区,经若干次繁殖后得到足够菌量置于指形管中,冰箱 -20℃ 条件下保存。

1.3 接种方法

当幼苗第 1、2 片真叶充分展开时采用夏孢子悬浮液接种,用浸湿毛笔蘸取含有 10^5 个/mL 夏孢子的悬浮液(加入 0.01% Tween-80),均匀涂抹到充分展开的第 1、2 片真叶背面。

1.4 H_2O_2 含量及 O_2^- 产生速率测定

在接种后 7、16、24、48 和 72 h 分别取样,采用 Mukherjee & Choudhuri^[10]的方法测定 H_2O_2 含量,用羟胺氧化法^[11]测定 O_2^- 产生速率。

1.5 H_2O_2 及 O_2^- 的组织化学定位

H_2O_2 组织化学定位按照 Thordal-Christensen 等^[12]的方法; O_2^- 检测采用 Jabs 等^[13]的 NBT 染色

法。均在接种后 7、16、24、48 和 72 h 取样处理,染色后用 OLYMPUS 微分干涉显微镜观察拍照,统计 30 个有染色反应的侵染点百分率。

2 结果与分析

2.1 受锈菌侵染的向日葵叶片 H_2O_2 含量及 O_2^- 产生速率的变化

未接菌条件下,抗、感病品种产生的 H_2O_2 和 O_2^- 在数值上没有明显差异。接菌后,两个品种的 H_2O_2 和 O_2^- 都急剧增加,即产生了氧化迸发现象,并呈双峰趋势,在接种后 16 h,均出现第 1 个峰值,但抗病品种的峰值比感病品种高,之后抗、感病品种 H_2O_2 含量下降,但抗病品种的 H_2O_2 含量仍高于未接种对照; O_2^- 产生速率也下降,而数值高于未接种对照。在接种后 48 h, H_2O_2 和 O_2^- 出现第 2 个高峰,但明显低于第 1 个峰值(图 1)。表明在病原菌侵染早期,抗、感病品种均大量产生活性氧,且抗病品种中,活性氧的量明显高于感病品种。

2.2 侵入位点 H_2O_2 的原位检测

DAB 染色显示,在感病品种上没有检测到明显的 H_2O_2 积累(图 2-A),而在抗病品种侵染点叶肉细胞中检测到 H_2O_2 的大量积累。在抗病品种中,接种后 7 h,即可在病菌侵染点(气孔位置)检测到 DAB 染色(图 2-B),出现染色的侵染点的比例达到 50%,之后染色比例升高;接种后 16 h 出现染色反应的比例达到最大,为 65.5%;接种后 24 h 为 57%,随后这一比例明显下降。从 H_2O_2 的组织化学染色图片中可以看出,染色最初出现在病原菌初生芽管入侵位点的寄主细胞;接种后 16 h,侵染位点周围的染色范围扩大,染色较深(图 2-C);随着时间推移染色逐渐变浅(图 2-D, E, F),染色反应的比例下降。表明抗病品种在受到锈菌侵染时侵染点及其周围细胞早期产生大量 H_2O_2 ,感病品种在整个侵染过程中侵染位点没有 H_2O_2 积累。

2.3 侵入位点 O_2^- 的原位检测

NBT 染色显示:受锈病菌侵染的感病品种中没有检测到 O_2^- 积累(图 3-A);而在抗病品种中,接种 7 h 就可在病菌侵染点检测到 NBT 染色,且染色程度较深(图 3-B),染色的侵染点为 34%;接种后 16 h,染色范围扩大到侵染位点周围的邻近寄主细胞,颜色也较深(图 3-C),此时出现染色的侵染点的比例达到最大,为 41%,之后染色比例逐渐下降;接种后 24 h, NBT 染色基本上保持不变(图 3-D),

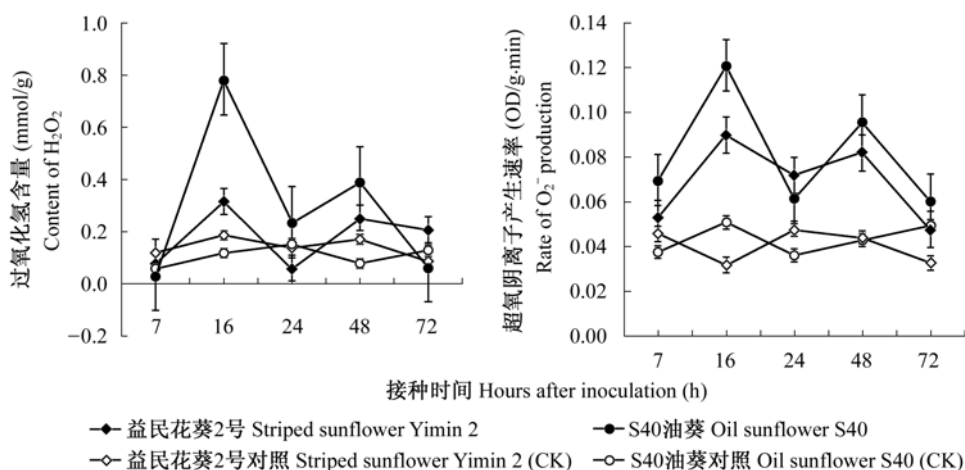


图1 不同向日葵品种 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率的变化

Fig. 1 Change of H_2O_2 content and O_2^- production rate of different sunflower varieties

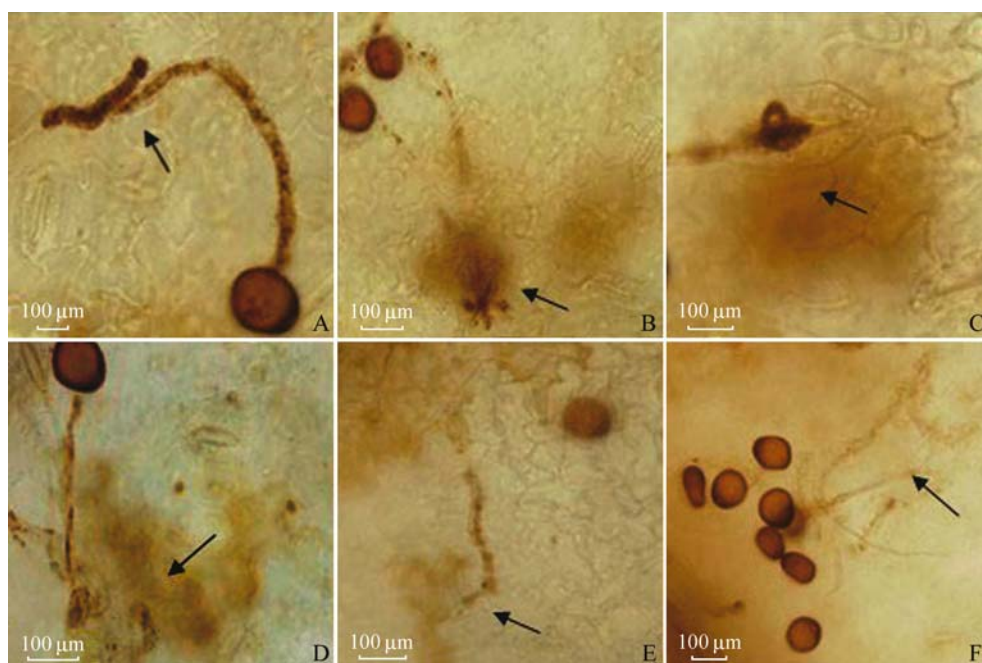


图2 向日葵叶片受侵染位点 H_2O_2 的 DAB 染色

Fig. 2 DAB staining of H_2O_2 at infection site of sunflower leaves

注: A: 感病品种接种后侵入位点的 DAB 染色; B ~ F: 分别是抗病品种接种后 7、16、24、48、72 h 侵入位点 DAB 染色。图中 DAB 染色呈红褐色(箭头示侵染位点)。Note: A: DAB staining at infection site of susceptible variety; B ~ F: DAB staining at infection site of resistant variety 7, 16, 24, 48, 72 hai. Reddish-brown as indicated DAB staining (infection site indicated by the arrow).

之后染色逐渐变浅(图 3 - E, F)。表明,抗病品种在受到锈菌侵染时侵染点及其周围细胞早期产生大量 O_2^- ,感病品种在整个侵染过程中侵染位点没有 O_2^- 的积累。

3 讨论

根据 Flor 的“基因对基因”学说,植物的抗性基因(R)和病原物的无毒基因(avr)产物相互识别后

通过信号传递激活各类防卫反应,诱导植物产生过敏性反应和系统获得性抗性。其中活性氧迸发被认为是过敏反应的特征性反应,也是植物对病原菌应答的最早期反应之一,在植物的防卫反应中起着重要的作用。Thordal-Christensen 等^[12]用 DAB 染色法首次发现大麦被白粉病菌侵染后产生乳突和过敏性反应的细胞中有活性氧积累,并认为活性氧积累与植物抗病性有关。其它的学者在研究水稻与基腐病

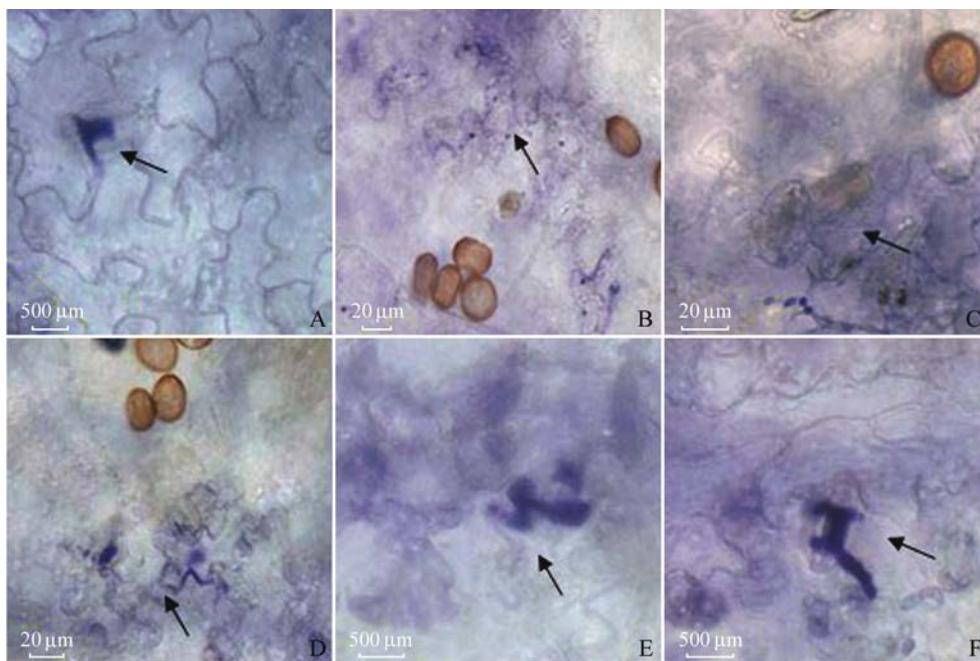


图3 向日葵叶片受侵染位点 O_2^- 的 NBT 染色

Fig.3 NBT staining of O_2^- at infection site of sunflower leaves

注: A: 感病品种侵入位点的 NBT 染色; B~F: 分别为抗病品种接种后 7、16、24、48 和 72 h 侵入位点的 NBT 染色。图中 NBT 染色呈蓝黑色(箭头示侵染位点)。Note: A: NBT staining at infection site of susceptible variety; B~F: NBT staining at infection site of resistant variety 7, 16, 24, 48, 72 hai. Dark-blue as indicated NBT staining (infection site indicated by the arrow).

菌^[14]、小麦与赤霉菌^[15]、水稻与白叶枯病菌^[16]互作及花生抗黄曲霉^[17]侵染过程中的活性氧代谢时,均发现抗、感病品种中的 O_2^- 和 H_2O_2 存在差异,抗病品种增长速率和增长量显著高于感病品种,这些都表明活性氧的产生和积累与植物抗病性有一定的关系,本研究也得到了相同的结论。然而,余文英等^[18]报道,抗疮痂病不同的两个甘薯品种染病后,感病品种甘薯叶片的 H_2O_2 和 O_2^- 等活性氧积累量高于抗病品种,这说明不同的植物-病原物互作体系中寄主抗性机制存在着差异。活性氧与植物抗病性间的关系,仍有待进一步探讨。

活性氧的检测方法有很多种,在组织化学法中最常用的是 DAB 和 NBT 法。本研究采用这两种方法对不同抗锈性向日葵的叶片进行活性氧的组织定位,在抗病品种中,侵染点活性氧的产生及积累较明显,而在感病品种中没有明显的染色反应; O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量在抗、感病品种中受病原菌侵染早期均有明显升高,这也说明不同抗性品种对病原菌的入侵均产生了抵抗。染色反应在感病品种的侵染点未检测出活性氧,原因可能是感病品种侵染点活性氧产生的量较少、染色灵敏度较低所致。另

外,作者观察到在抗病品种中非侵染位点的气孔保卫细胞有明显的 DAB 染色反应,说明有大量的 H_2O_2 积累,气孔保卫细胞对外界刺激非常敏感,植物被病原菌侵染时可能通过产生 H_2O_2 导致气孔关闭而阻止病原菌继续通过气孔侵入^[19]。

参 考 文 献(References)

- [1] 刘杰, 莫结胜, 刘公社, 等. 向日葵分子生物学研究进展. 植物学通报, 2001, 18(1): 31-39
- [2] Mohase L, Westhuizen A J, van der Pretorius Z A. Induced defence responses and rust development in sunflower. South African Journal of Science, 2006, 102(3/4): 144-150
- [3] Peng M, Kuc J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. Phytopathology, 1992, 82(6): 696-699
- [4] Bradley D J, Kjelborn P, Lamb C J. Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. Cell, 1992, 70(1): 21-30
- [5] Devlin W S, Gustine D L. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. Plant Physiology, 1992, 100(3): 1189-1195
- [6] Apostol I, Heinsteins P F, Low P S. Rapid stimulation of an oxi-

- dative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology*, 1989, 90(1): 109–116
- [7] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 1994, 105(2): 467–472
- [8] Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 2005, 89(7): 1113–1121
- [9] Gechev T S, Breusegem F, van Stone J M, et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 2006, 28(11): 1091–1101
- [10] Mukherjee S P, Choudhuri M A. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 1983, 58(2): 166–179
- [11] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990(6): 55–57
- [12] Thordal-Christensen H, Zhang Z G, Wei Y D, et al. Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 1997, 11(6): 1187–1194
- [13] Jabs T, Dietrich R A, Dangel J L. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 1996, 273(5283): 1853–1856
- [14] 刘琼光, 和兰娣, 张静一, 等. 水稻与基腐病菌互作中的活性氧代谢. *华中农业大学学报*, 2007, 26(4): 451–455
- [15] 陶宗娅, 田小凤, 向述莲, 等. 赤霉菌粗毒素对小麦幼苗活性氧代谢的影响. *西南农业大学学报(自然科学版)*. 2005, 27(6): 851–854
- [16] 饶力群, 李劲, 官春云, 等. 稻白叶枯病菌对水稻悬浮细胞 H_2O_2 含量及其代谢酶活性的影响. *湖南农业大学学报*, 1999, 25(6): 437–442
- [17] 梁炫强, 潘瑞炽, 周桂元. 活性氧及膜质过氧化与花生抗黄曲霉侵染的关系. *中国油料作物学报*, 2002, 24(4): 19–23
- [18] 余文英, 潘廷国, 柯玉琴, 等. 甘薯抗疮痂病的活性氧代谢研究. *河南科技大学学报(农学版)*, 2003, 23(3): 1–6
- [19] 张正光, 王源超, 蔡炳江, 等. H_2O_2 、NO 和 Ca^{2+} 参与疫病菌激发子 PB90 诱导烟草气孔的关闭. *植物病理学报*, 2007, 37(1): 62–68