

一氧化氮在寡糖素诱导的小麦对条锈菌系统获得抗性中的时序性*

郭萍^{1,2)} 李落叶¹⁾ 曹远林²⁾ 赵保路²⁾** 李振岐¹⁾**

(¹⁾西北农林科技大学植保学院, 杨凌 712100; ²⁾中国科学院生物物理研究所脑与认知科学研究中心, 北京 100101)

摘要 研究了寡糖素在诱导感病小麦品种辉县红系统抗条锈性中的作用, 同时利用 ESR 测定了系统获得抗性 (SAR) 中一氧化氮 (NO) 的时间进程, 结果表明寡糖素可以诱导辉县红对条锈菌毒性小种 CY29-1 的系统抗性, 此系统抗性与内源 NO 信号启动的时间及强度有关。

关键词 系统获得抗性, 小麦, 条锈菌, 寡糖素, 一氧化氮, 过敏性坏死反应

学科分类号 S435.121.42

条锈菌 (*Puccinia striiformis* Westend) 引起的小麦条锈病是世界上许多地区小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的重要病害^[1]。利用抗病品种是防治小麦条锈病的主要措施。但是小麦品种抗条锈性的丧失是应用抗病品种面临的重要问题之一^[2]。因此利用非专化的防卫反应是克服这一问题的手段之一。近年发现有些生化制剂和生物制剂, 以及植物水解产物低聚糖类都能诱发系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR)^[3]。

SAR 的反应非常复杂, 抗性反应途径的信号分子包括了各种酸类物质以及活性氧和一氧化氮^[4]。过敏性坏死反应 (HR) 是抗病反应的重要标志。近年来的研究认为 HR 与活性氧和活性氮有关。由于一氧化氮 (NO) 功能的多样性及其存在的普遍性, 目前关于 NO 的研究不仅局限于动物界, 在植物方面也有很大的进展, 尤其在植物病理方面^[2,5]。NO 与活性氧在活化动植物抗病机制中具有重要的作用。例如, 动物中 NO 与活性氧协同作用可杀死肿瘤细胞和细菌。尽管在植物中关于 NO 的研究还处于初级阶段, 但已取得了许多结果。用 NO 供体 NOR-18 处理马铃薯块茎可以诱导抗菌类物质——植保素的累积^[6]。同时证明 NO 可以保护致病疫霉侵染的马铃薯叶片中的叶绿素水平^[7]。在烟草-假单胞病害体系中, NO 供体可以激发过敏性坏死反应^[8]。

本文利用从大豆中提取的寡糖素诱导了感病小麦品种对毒性条锈菌小种 CY29-1 的抗病性, 该反应型出现了典型的 HR 反应, 同时通过利用 ESR 测定病程中 NO 的动态变化, 明确了寡糖素诱导的抗锈性中 NO 的作用。结果表明在寡糖素诱导的

SAR 中 NO 启动的时间和强度与抗病表型相关。

1 材料与方法

1.1 供试材料

小麦品种辉县红, 是常规的感病品种; CY29-1 是条中 29 号的单胞菌系。菌种由西北农林科技大学植物免疫研究室提供, 所用小种在鉴别寄主上进行了确认。

1.2 化学试剂

HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) 购自 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯, 测试溶液以双蒸水配制。

寡糖素为西北农林科技大学植保学院植物免疫研究室根据余露等^[9]的方法改进研制。

1.3 方法

1.3.1 外源诱导处理: 将寡糖素配制成 2.5 nmol/L 的浓度, 在小麦一叶展平期喷洒处理, 经过 5 d 诱导, 接种条中 29-1 单胞菌系, 保湿 24 h 后, 在温室 12~18℃, 光照 14 h 的标准条件下培养。对照充分发病时, 调查寡糖素的诱导效果。抗性指标包括: 相对病斑面积=病斑面积/叶面积(%), 过敏性坏死反应 (HRR) 的相对面积=HRR 面积/叶面积(%) 和 HR 的频率。

1.3.2 ESR 测定小麦植株体内 NO 的时间进程: 接种后每隔 24 h 取样一次直至第 13 天, 每处理设

* 国家教育部博士点基金资助项目和国家自然科学基金资助项目 (39770486, 30070196)。

** 通讯联系人。

¹⁾** Tel: 029-7092234, E-mail: ylulzq@public.xa.sn.cn

²⁾** Tel: 010-64888569, E-mail: baoluzhao@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2002-04-11, 接受日期: 2002-05-25

置三个重复, 每重复取样 3~5 个叶片。

样品的处理和测定参照文献 [10] 略有改进。样品加入 pH 7.4 的 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (内含 0.32 mol/L 的蔗糖, 10 mmol/L 的 HEPES, 0.1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 的巯基乙醇) 在冰浴中研磨, 4℃下 13 201 *g* 离心 20 min, 吸取上清液 225 μ l 加入 0.5 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、0.3 mol/L FeSO_4 、0.6 mol/L DETC、10 mmol/L 精氨酸各 5 μ l, 37℃温浴反应 1 h, 用 200 μ l 乙酸乙酯抽提, 在 BRUKE 型 ER200D-SRC 顺磁仪上测定, 调制频率 100 kHz, 调制幅度 3.2 G, 中心磁场 3385 G, 扫宽 400 G, 扫描时间 200 s, 增益 5×10^5 。

2 结 果

2.1 寡糖素对小麦抗条锈性的诱导效果

辉县红对条中 29 号小种的侵入呈现感病反应。寡糖素渗透处理叶片后, 经过一定的诱导期, 寄主表现出了很强的抗病性 (表 1)。相同浓度的寡糖素处理的小麦当天接种条 29 号小种的单胞菌系 CY29-1 后, 寄主与对照 (清水处理) 没有任何差

异, 而经过一定的诱导期后 (5 d), 寡糖素处理的寄主表现出了典型的低反应型抗性, 在显症期经过诱导处理的寄主发生了普遍的过敏性坏死反应, 病斑面积较对照降低了近 40%; 对照在显症期没有任何过敏性坏死反应发生, 叶片完全感病, 如图 1 所示, 对照大量产孢而无 HR 症状, 而经过寡糖素处理的寄主产孢量明显受到过敏性坏死反应的限制, 产孢面积明显降低。

Table 1 The induced resistance of Huixianhong to stripe rust by oligosaccharin

Index	The statistical effect of 2.5 nmol/L oligosaccharin induced resistance on Huixianhong to CY29-1 after infiltration 5 days ($n=40$)	
The relative area of disease	Treat	63 ± 14.7
	Control	100 ± 0
The relative area of HR	Treat	25 ± 13.8
	Control	0 ± 0
The number of HR	Treat	18 ± 5.5
	Control	0 ± 0

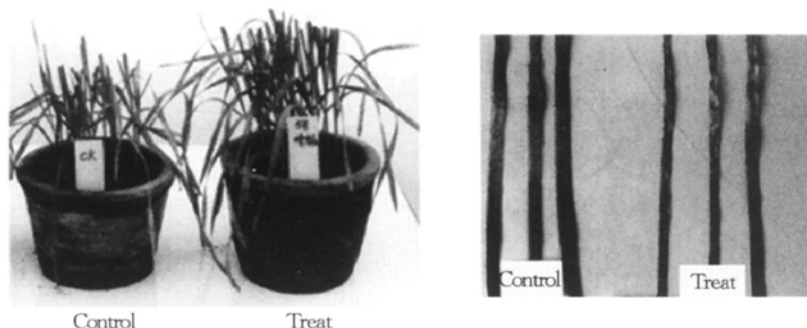


Fig. 1 The symptoms of HR induced by oligosaccharin

2.2 寡糖素诱导小麦抗条锈病内源 NO 时间进程

目前普遍认为植物的过敏性细胞死亡是程序性细胞死亡 (PCD) 的一种形式。动物和植物的 PCD 有许多相似的功能。NOS 抑制剂可以降低拟南芥和大豆细胞悬浮液由激发子和病菌引起的 HR 抗性反应^[4]。寡糖素诱导的高抗反应呈现出典型的 HR 反应, 为了探讨这一反应与 NO 的关系, 我们研究了内源 NO 的动态变化趋势 (图 2), 标准图谱见图 3 (接种后第 1 天)。

从图 2 可以看出, 两个互作体系中内源 NO 在取样时间区间内的变化趋势不同。对照 NO 的时间进程总体呈现逐渐上升的态势, 而诱导处理的 NO

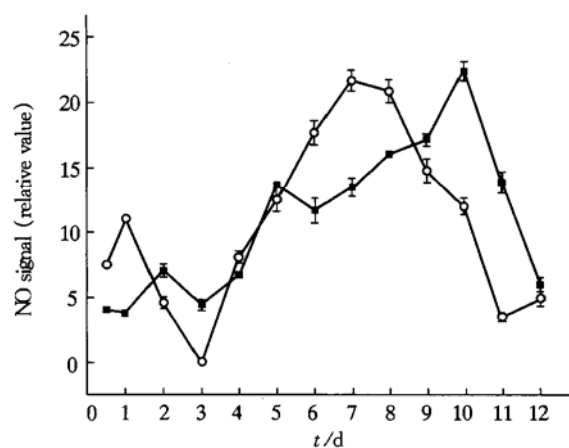


Fig. 2 The time course of endogenous NO within host
■—■: control; ○—○: treat.

时间进程具有明显的双峰起伏. 第1峰出现在病原菌萌发后的侵入期, 第2峰出现在病原菌潜伏-发病的临界期. 对照内源 NO 的累积虽然在第2天和第5天增加幅度较大, 但接种后第10天前的所有时间点产生的 NO 基本为一条逐渐上升的曲线, 第10天达到最大值, 其后组织内产生的 NO 急剧下降. 寡糖素诱导处理后寄主产生的 NO 在接种后的第1天出现了第1峰, 其后开始下降至第3天 NO 达到最低值, 随后 NO 再次上升, 第7天达到第2个高峰, 处理的第2峰较对照的峰值提前了3天.



Fig. 3 The spectrum of NO in wheat

病菌与寄主互作后内源 NO 的动态变化依据抗性的不同在时间和强度上均有差异. 从图2可以看出, 侵入期对照未出现 NO 累积峰, 而抗病反应的 NO 峰较潜伏期低, 潜伏期虽然对照也出现了 NO 高峰, 但较处理晚出现3天. 因此, 诱导抗性反应与感病反应的差异有两点, 其一是侵入期 NO 峰的出现, 其二是潜伏-发病的临界期 NO 信号峰的强弱.

3 讨 论

低聚糖素是一种特殊的化学信号, 可以启动和调节植物的防御系统. 近年来, 国内外开始研究利用植物低聚糖素改良植物自身的防御免疫系统, 达到生物防治病虫害的效果. 低聚糖素在小麦的大田区试结果表明对赤霉菌有明显的效果^[10]. 我们的试验结果表明寡糖素可以诱导小麦对条锈菌的抗性, 为生产应用提供了初步证据.

内源 NO 的时间进程及其在小麦与条锈菌病理体系中的功能尚未见报道, 对于内源 NO 的 ESR 测定, 一般都是利用血红蛋白测定细胞培养体系中释放的 NO, 但此方法无法排除活性氧的干扰, 而 ESR 方法对 NO 具有排他性的共振信号^[2]. 通过 ESR 监测其内源 NO 的时间进程发现诱导的抗病性可能与 NO 的变化相关联. 抗病反应与感病反应的最大区别是在显症前抗病反应呈现出 NO 爆发的双峰变化, 而感病反应仅仅只有潜伏期的单峰变

化. 其他病理体系中对内源 NO 的研究也仅限于悬浮细胞体系中, 在大豆细胞与丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 互作的病理体系中, 抗病体系与感病体系 NO 产生的第1峰都很弱, 没有差异, 而 NO 第2峰在抗病体系中产生的量显著高于感病体系^[6]. 本研究与其他研究结果的差异可能来源于不同的病害体系, 也可能来源于细胞体系与植物组织的空间分隔的差异, 条锈菌是气孔入侵的专性寄生菌, 寄主的叶表结构对条锈菌的入侵具有一定的影响, 因此对其研究采用细胞培养系是不可能的.

植物诱导抗病性由于其自身独特的优点, 对于保护那些品质好但较感病的植物品种具有特殊的意义, 通过将诱导制剂只在植物敏感期或病害盛期期作用于植物敏感部位而激活植物防御功能并节省能量, 最大限度地提高诱导抗性的保护效率. 这对现代植物保护将具有深远的意义.

参 考 文 献

- 1 Stubbs R W. Pathogenicity analysis of yellow (stripe) rust of wheat and its significance in a global context. In: Simmonds N W, Rajaram S, eds. Breeding Strategies for Resistance to The Rusts of Wheat. Mexico: CIMMYT, 1988. 23~ 38
- 2 Cao Y L, Niu Y C, Zhao B. Study of the effects of No on wheat stripe rust by ESR. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 33 (supplement1): 74
- 3 Kuć J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. Crop Protection, 2000, 19: 859~ 861
- 4 Delledonne M, Xia Y J, Dixon R A, et al. Nitric oxide function as a signal in plant disease resistance. Nature, 1998, 394 (6): 585 ~ 588
- 5 Durner J, Wendohenne D, Klessing D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic ADP-ribose. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95 (10): 328~ 333
- 6 Noritake T, Kawakita K, Doke N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissue. Plant Cell Physiol, 1996, 37: 113~ 116
- 7 Laxalt A M, Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. Eur J Plant Pathol, 1997, 73: 643~ 651
- 8 Huang J S, Knopp J A. Involvement of nitric oxide in Ralstonia solanacearum induced hypersensitive reaction in tobacco. In: Prior P, Elphinstone J, Allen C, eds. Proceedings of The Second International Wilt Symposium, France: INRA, 1997. 218~ 224
- 9 余露, 李 伟, 谭 健, 等. 低聚糖提高小麦的抗病性及其应用于防治小麦赤霉病的研究. 生物工程进展, 1995, 15 (6): 36~ 39
- 10 Yu L, Li W, Tan J, et al. Progress in Bioengineer Sin, 1995, 15 (6): 36~ 39
- 11 Zhang D, Xiong J, Hu J, et al. Improved method to detect nitric oxide in biological systems. Appl Magn Reson, 2001, 20: 345~ 356

The Time Course of Endogenous NO in The Systemic Acquired Resistance of Wheat to Stripe Rust Induced by Oligosaccharide*

GUO Ping^{1,2)}, LI Luo-Ye¹⁾, CAO Yuan-Lin²⁾, ZHAO Bao-Lu^{2)**}, LI Zhen-Qi^{1)**}

¹⁾ College of Plant Protection, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

²⁾ Center of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The role of oligosaccharin in the induced resistance of wheat Huixianhong to CY29-1 was studied. Meantime, the time course of endogenous NO was detected by ESR. The results revealed that the oligosaccharin coming from soybean could induce the systemic acquired resistance (SAR) and the SAR may be initiated by endogenous NO.

Key words systemic acquired resistance, wheat, stripe rust (*Puccinia striiformis* Westend), oligosaccharide, nitric oxide, hypersensitive response

* This work was supported by grants from Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China and The National Natural Science Foundation of China (39770486).

** Corresponding author.

^{1)**} Tel: 86-29-7092234, E-mail: ylaulzq@public.xa.sn.cn; ^{2)**} Tel: 86-10-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

Received: April 11, 2002 Accepted: May 25, 2002

中国生物工程杂志 (月刊) 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国生物工程杂志》(原名《生物工程进展》)是由科技部中国生物工程开发中心与中国科学院文献情报中心共同主办的全国性专业学术期刊,中国生物工程学会会刊,主要报道我国生物技术研究开发的重要成果和国内外生物工程研究与产业化进展。本刊旨在反映生物工程学科的学术水平与发展动向,报道本学科重大研究成果与进展,推进生物工程领域的学术交流,引导研究人员的科研活动与研究方向,促进生物技术新理论与新技术的传播,促进我国生物技术产业化。《中国生物工程杂志》设有研究报告、研究简报、综述与进展、学科前沿、专题论述、技术与方法、评论、动态、产业报道、市场、知识产权、会讯等栏目,突出刊物的学术性、前沿性、指导性和实用性。本刊发行覆盖全国各省、自治区、直辖市以及香港、台湾地区,和国外建立有广泛的刊物交换联系(中国科学院图书馆生命科学类国际期刊交换业务)并被国内外著名检索系统和相关文摘类期刊收录。

为进一步提高学术报道质量,本刊调整补充了一批工作在生物技术前沿的高水平审稿专家,并从2003年起改为月刊,将大大缩短稿件发表周期。

《中国生物工程杂志》刊号:ISSN 1671-8135, CN 11-4816/Q, 邮发代号:82-673, 每期定价15元,全国各地邮局均可订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

通信地址:北京市中关村北四环西路33号, 邮政编码:100080

电话:010-82624544, 010-82626611-6631, 传真:010-82624544

电子信箱:biotech@mail.las.ac.cn, chinabiotech@263.net