

水稻叶鞘 3 种氧化还原酶活性在褐飞虱胁迫中的变化

罗海平^{1,2}, 蔺万煌^{1,2*}, 刘建丰³

(1 湖南省植物激素与生长发育重点实验室, 长沙 410128, 2 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128, 3 湖南农业大学水稻研究所, 长沙 410128)

摘要 为阐明水稻抗褐飞虱的机制, 分析了褐飞虱为害对感、抗虫水稻品种叶鞘中 3 种保护酶活性的影响。采用苗期群体接虫方法对水稻品种进行抗性鉴定, 在此基础上测定了褐飞虱为害前后水稻叶鞘中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性。受褐飞虱为害后, 抗虫和感虫品种叶鞘中 SOD 活性均上升, 表明无论是抗性植株还是感性植株在清除超氧阴离子自由基方面都具有较强的能力, POD 活性在抗虫品种中下降, 而在感虫品种中增加, 表明抗性品种较感性品种具有更强的酶促抗氧化性能, 从而对褐飞虱胁迫具有更强的适应能力。CAT 活性在抗虫品种中增加, 而在感虫品种中大幅下降, 这与其对褐飞虱抗性弱密切相关。

关键词 水稻, 褐飞虱, 超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD), 过氧化氢酶(CAT)

中图分类号 S 511, S 435 112.3

Activity changes of three dehydratases in rice sheath under stresses of *Nilaparvata lugens*

Luo Haiping^{1,2}, Lin Wanhuang^{1,2}, Liu Jianfeng³

(1 *Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth & Development, Changsha 410128, China*;
2 *College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China*,
3 *Rice Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China*)

Abstract The activities of three protective enzymes in rice sheath were analyzed before and after *Nilaparvata lugens* stress, so as to provide reference for clarifying the mechanism of the resistance to *N. lugens*. The resistance of rice varieties to *N. lugens* were appraised by the method of colonizing seedling rice plants and comparing the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in rice sheath before and after stresses of *N. lugens*. After the infestation of *N. lugens*, the activity of SOD increased in both resistant and susceptible varieties, which showed that both resistant and susceptible varieties have strong ability to scavenge superoxide anion radical, the activity of POD decreased in resistant varieties and increased in susceptible varieties, which showed that resistant varieties have stronger enzymatic antioxidant function than susceptible varieties. It is suggested that the resistant varieties have stronger adapting ability under stresses of *N. lugens*. The activity of CAT increased in resistant varieties and decreased greatly in susceptible varieties, which is closely related to low resistance of susceptible varieties under stresses of *N. lugens*.

Key words rice, *Nilaparvata lugens*, superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT)

在生物体内, 氧被视为电子传递的受体, 得到电子时能生成超氧阴离子自由基及其衍生物 HO· 和

收稿日期 2008-03-26 修订日期 2008-06-06

基金项目 湖南省自然科学基金项目(07JJ3078)

* 通讯作者 E-mail whlm@hunau.net

H₂O₂ 等活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS), 在正常生理状况下, 植物体内不断产生 ROS, 同时又不不断地被清除, 因而不会对植物机体造成伤害^[1]。但是遭遇胁迫时, 体内 ROS 会过量积累, 致使膜脂过氧化水平提高, 膜的透性增加, 膜结构及其功能受到损伤, 最终对生物体引起危害。活性氧清除系统 3 个主要酶, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 能有效抑制 ROS 对机体的伤害, 其中 SOD 可以清除超氧阴离子自由基并反应生成 H₂O₂, CAT 能进一步催化 H₂O₂ 分解成 H₂O 和 O₂, POD 则具有分解 H₂O₂ 的能力, 正是这 3 种酶的彼此协调、相互作用, 使细胞内的 ROS 保持正常水平, 减轻 ROS 对生物体造成的毒害, 提高生物体抗逆境能力^[2]。

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 是亚洲水稻上的主要害虫, 为害严重时引起稻株下部变黑、腐烂发臭、倒瘫 (虱烧), 导致水稻减产或失收^[3]。目前, 对褐飞虱的防治主要依赖于化学农药, 但长期使用化学农药不但增加了生产成本, 且易造成其抗药性及环境污染^[4]。褐飞虱为害水稻, 可引起水稻植株保护酶活性发生变化。水稻叶鞘是褐飞虱为害的主要部位^[5], 本研究分析了褐飞虱为害对感虫性、抗虫性水稻叶鞘中 3 种保护酶活性的影响, 旨在为阐明水稻抗褐飞虱的机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试水稻材料

湖南农业大学水稻研究所刘建丰博士提供的水稻种子: 香 187、湘晚籼 1 号、IR36、IR64、R998、象牙占、27H328、27H333。经连续几年田间栽培观察, 香 187、湘晚籼 1 号、IR36、IR64 对褐飞虱抗性较强; R998、象牙占、27H328、27H333 对褐飞虱抗性较差。其中, 香 187 为刘建丰博士培育的水稻新品种。

1.1.2 供试虫源

来自长沙市芙蓉区湖南农业大学试验田, 鉴定为生物型 1 和生物型 2 的混合种群。在湖南农业大学植物激素实验室网室内饲养, 将褐飞虱放入 40 cm × 40 cm × 40 cm 的自制饲养箱中, 饲喂感虫水稻 ZR-1 幼苗, 繁殖褐飞虱。

1.2 研究方法

1.2.1 褐飞虱抗性鉴定

将水稻种子播入 50 cm × 35 cm × 10 cm 的试验盆, 土层约 5 cm, 每个品种播 1 行, 每行 10 粒, 每粒

种子之间相距 3 cm, 行距约 4 cm。待 2~3 叶期, 将苗补齐为每行 10 株, 放入褐飞虱成虫, 数量为每株 6~8 头, 共设 6 个重复。待 R998 (对照) 死苗率达到 95% 以上时, 统计其他水稻品种的死苗率, 按照中国水稻所刘光杰等的苗期群体接虫方法进行抗性鉴定^[6] (表 1)。

表 1 水稻品种抗稻飞虱鉴定评价标准

抗性级别	死苗率/%	抗性水平
0	<1.0	免疫
1	1.1~10	高抗
3	10.1~30	抗
5	30.1~50	中抗
7	50.1~70	中感
9	>70.1	感

1.2.2 保护酶活性测定材料处理方法

在湖南农业大学植物激素实验室网室进行。2007 年 5 月 27 日将生长发育进程和长势一致的同一个品种植株移栽于直径 30 cm, 高 20 cm 盆钵中, 每钵 6 株, 在盆钵上罩防褐飞虱进出, 高 1.5 m 的细眼纱网, 每个纱网中放入褐飞虱成虫 50 头, 重复 5 次, 作为处理; 同时将生长发育进程和长势一致的同一个品种植株移栽于直径 30 cm, 高 20 cm 盆钵中, 每钵 6 株, 不罩纱网, 和处理样品严格隔离, 重复 5 次, 作为对照。进行常规水、肥管理, 待水稻植株苗龄 60 d 时, 随机取每个水稻品种处理、对照叶鞘, 用于保护酶活性测定。

1.2.3 保护酶活性的测定

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法测定^[7], 过氧化物酶 (POD) 活性参照愈创木酚法^[8], 加以改进酶活性测定反应体系: 2.7 mL 磷酸缓冲液、1.0 mL 2% H₂O₂、1.0 mL 0.05 mol/L 愈创木酚和 0.3 mL 酶液; 过氧化氢酶 (CAT) 活性采用高锰酸钾滴定法测定^[9]。

1.2.4 数据分析方法

本试验数据分析采用 Excel 和 DPSv2.00 软件进行统计分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 供试水稻品种对褐飞虱的抗性反应

苗期群体鉴定结果如表 2 所示, 以 R998 为感虫对照品种, 当 R998 死苗率达到 96.3% 时, 象牙占的死苗率也达到了 75.0%, 表现为感虫; 27H328 和 27H333 的死苗率分别为 55.0% 和 53.3%, 表现为中感; 香 187 和湘晚籼 1 号的死苗率分别为 43.3% 和 48.3%, 表现为中抗; IR36 和 IR64 的死苗率分别为 28.3% 和 21.7%, 均表现为抗虫。说明 IR36 和

IR64 在水稻抗稻飞虱育种中具有潜在利用价值,可发掘其抗性基因,用于水稻新品种的培育;同时,香187 作为水稻新品种,本试验结果显示其具有明显抗褐飞虱能力,为其扩大区试以及大面积推广提供了一定的参考依据。

表 2 水稻品种对褐飞虱的抗性反应

供试品种	死苗率/%	抗性级别	抗性水平
R998	96.3	9	感
象牙占	75.0	9	感
27H328	55.0	7	中感
27H333	53.3	7	中感
香 187	43.3	5	中抗
湘晚籼 1 号	48.3	5	中抗
IR36	28.3	3	抗
IR64	21.7	3	抗

2.2 供试水稻品种受褐飞虱为害后叶鞘保护酶活性的变化

2.2.1 褐飞虱为害对供试水稻品种叶鞘 SOD 活性的影响

SOD 是植物体内清除 ROS 的关键酶,其活性的强弱与植物抗虫能力密切相关^[1]。由图 1 可知,褐飞虱为害水稻后,抗虫和感虫品种的叶鞘 SOD 活性均有不同程度上升,尤其是 IR64,上升的幅度最大,达到 114.12%。差异显著性分析表明,除 R998 和 27H333 外,其他品种在受到褐飞虱胁迫后 SOD 活性均显著增大,湘晚籼 1 号、IR64 达到了极显著性差异。

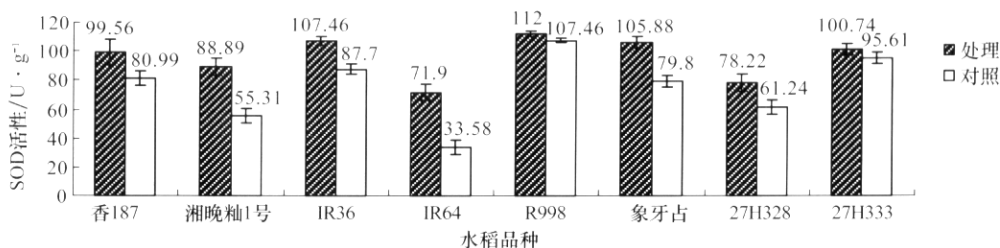


图 1 褐飞虱为害后叶鞘中 SOD 活性的变化

2.2.2 褐飞虱为害对供试水稻品种叶鞘 POD 活性的影响

由图 2 可知,感虫品种的叶鞘 POD 活性均有不同程度上升,而抗虫品种的叶鞘 POD 活性都下降了 20%~30%。在供试品种褐飞虱胁迫和对照间叶鞘 POD 活性的差异显著性比较中,抗性品种

都达到了显著性差异,湘晚籼 1 号、IR64 达到了极显著性差异;而感性品种差异都不显著。由此可见,褐飞虱为害对抗性品种叶鞘保护酶活性的影响较感性品种更大,抗性品种较感性品种具有更强的酶促抗氧化性能从而对褐飞虱胁迫具有更强的生长适应能力。

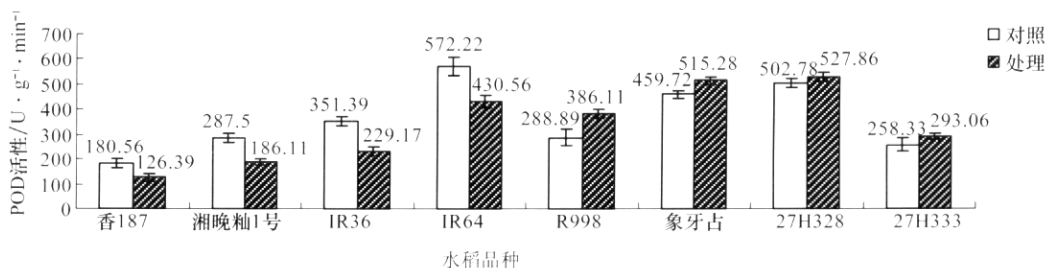


图 2 褐飞虱为害后叶鞘中 POD 活性的变化

2.2.3 褐飞虱为害对供试水稻品种叶鞘 CAT 活性的影响

昆虫的入侵可以诱导植物产生大量的活性氧 (ROS),即引起氧化爆发 (oxidative burst)^[10]。但 CAT 是植物体内 H₂O₂ 等活性氧的清除酶,它与 SOD 协同作用维持体内活性氧代谢平衡^[11-12]。由图 3 可知,感虫品种的叶鞘 CAT 活性无一例外都下降了

20%~40%,而抗虫品种的叶鞘 CAT 活性都有不同程度上升,其中 IR36 和 IR64 上升的幅度较大,分别达到了 79.41%和 65.85%。在供试品种褐飞虱胁迫和对照间叶鞘 CAT 活性的差异显著性比较中,与抗性品种不同的是,感性品种都表现出了显著性差异。由此可见,感性品种在遭褐飞虱胁迫后,CAT 活性下降幅度大,这与其对褐飞虱抗性弱密切相关。

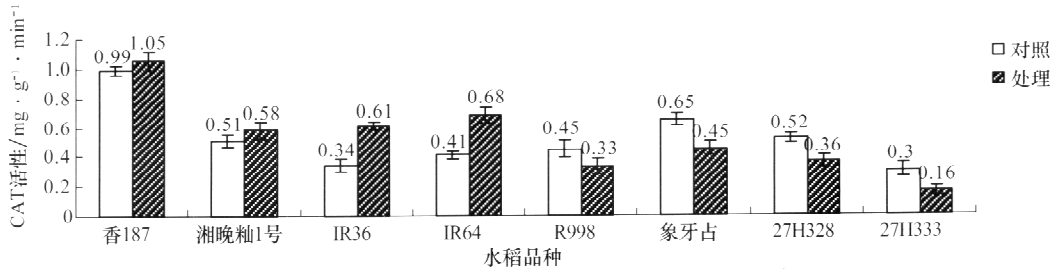


图3 褐飞虱为害后叶鞘中CAT活性的变化

3 讨论

本试验研究结果表明,水稻受到褐飞虱为害时,叶鞘中SOD、POD和CAT活性会发生相应的变化:抗虫和感虫品种的叶鞘SOD活性均有不同程度上升,表明无论是抗性植株还是感性植株在清除更多的超氧阴离子自由基方面都具有较强的能力,同时抗性品种IR64SOD活性上升幅度最大,这与其抗性水平较高直接相关;而POD和CAT的变化正好相反,表明两者在消除H₂O₂对植株的毒害从而增强其抗褐飞虱能力方面既有协同作用,可能又存在相互拮抗作用;另外,刘裕强等报道,CAT活性在抗虫品种稻株体内明显受抑制,但在感虫品种植株体内CAT的活性略有提高^[3],和本文的结果相悖,这有待于进一步研究。

CAT也是植物植保素合成、激活后期功能防御基因的重要因子^[13-14]。CAT活性与水杨酸(SA)含量关系密切^[15],Chen等研究发现SA通过抑制CAT的活性,从而引起H₂O₂的增加^[16]。因此,水稻受到褐飞虱为害时,抗、感品种叶鞘中H₂O₂和SA含量的变化和叶鞘CAT活性变化的内在联系有待于进一步的试验来证实。

植物保护酶对植物体内ROS水平有直接影响,ROS过量积累将导致植株膜脂过氧化水平提高,而丙二醛通常被认为是膜脂过氧化的一个重要指标^[17]。刘裕强等研究发现,褐飞虱为害显著增加了抗、感品种稻株体内丙二醛含量,因此他们认为,褐飞虱为害引起了水稻植株膜脂的过氧化^[1]。但是,褐飞虱是否通过影响保护酶活性而引起水稻植株膜脂的过氧化还没有统一的结论。因此,水稻受到褐飞虱为害时,抗、感品种叶鞘中丙二醛含量的变化和叶鞘保护酶含量变化的内在联系将是一个重要的研究方向。

本研究发现褐飞虱的危害引起了水稻抗逆防御反应中叶鞘的一些保护酶活性发生了一系列的变化,这为探明水稻抗褐飞虱的分子机理的研究提供了理论基础,进一步明确了方向。但是要彻底阐明

其中的机制还有待于对SOD、POD和CAT这3种酶相互作用的深入研究。

参考文献

- [1] 刘志文,沙爱华,王英. 活性氧物质在植物抗病中的作用[J]. 安徽农业科学,2005,33(9):1705-1707.
- [2] 张金锋,薛庆中. 稻飞虱为害胁迫对水稻植株内主要保护酶活性的影响[J]. 中国农业科学,2004,37(10):1487-1491.
- [3] 刘裕强,江玲,孙立宏,等. 褐飞虱刺吸诱导的水稻一些防御性酶活性的变化[J]. 植物生理与分子生物学报,2005,31(6):643-650.
- [4] 程遐年,吴进才,马飞. 褐飞虱研究与防治[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [5] 黄次伟,冯炳灿. 水稻白背飞虱、褐飞虱取食动态研究[J]. 昆虫学报,1993,36(2):251-255.
- [6] 刘光杰,付志红,沈君辉,等. 水稻品种对稻飞虱抗性鉴定方法的比较研究[J]. 中国水稻科学,2002,16(1):52-56.
- [7] 萧浪涛,王三根. 植物生理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2005:215-218.
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:164-165.
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:165-167.
- [10] Orozco-Cardenas M L, Narvaez-Vasquez J, et al. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induced of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate[J]. Plant Cell, 2001,13:179-191.
- [11] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response[J]. Cell,1994,79:583-593.
- [12] Brisson L F, Tenhaken R, Kamb C. Function of oxidative cross-linking of cells wall structural proteins in plant disease resistance[J]. Plant Cell,1996,6:1703-1712.
- [13] Devlin W S, Gustine D L. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and hypersensitive reaction [J]. Plant Physiol,1992,100:1189-1195.
- [14] Allen R G, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation [J]. Free Radical Biol Med,2000,28:463.
- [15] Leon J, Lawton M A, Raskin I. H₂O₂ stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco[J]. Plant Physiol, 1995,108:1673-1678.
- [16] Chen Z, Silva II, Klessig D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid

-
- [J] Science, 1993, 262 1883 - 1886
- [17] Bailly C, Benamar A, Corbincau F, et al Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, CAT and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging[J] Plant Physiol, 1996, 97 104 - 110