

研究报告

哈茨木霉对水稻过氧化物酶及多酚氧化酶活性的影响*

黄有凯 罗曼** 蒋立科 李江遐

(安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

摘要: 哈茨木霉不仅对病原微生物有拮抗作用, 而且能够诱导植物产生抗病性。采用酶动力学扫描及垂直板凝胶电泳技术, 对水稻喷施木霉发酵液后, 测定多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)活性和同工酶带图谱的动态变化。与对照组相比, 哈茨木霉不仅能够提高PPO和POD酶的活力, 而且还能诱导产生新的同工酶谱带, 但不同浓度发酵液对诱导合成的酶作用不同。稀释50倍的发酵液对POD活力有较大的阳性效应。高浓度的发酵液对PPO活性有先抑制后出现提高的趋势, 表明了该发酵液对PPO活性调节的程序性。

关键词: 多酚氧化酶, 过氧化物酶, 哈茨木霉, 诱导抗性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0001-04

EFFECTS OF TRICHODERMA HARZIARUM ON POLYPHENOL OXIDASE AND PEROXIDASE IN RICE

HUANG You-Kai LUO Man JIANG Li-Ke LI JIANG-Xia

(College of life sciences Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract: *Trichoderma harziaarum* plays a role of antagonistic ability to pathogenic microbes and of inducing plant to produce a resistivity of disease. In this paper, after the rice was sprinkled by zymolytic liquid of *Trichoderma harziaarum*, the changes on the activities and isoenzymes of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) were investigated. The results indicated that *Trichoderma harziaarum* could increase the activities of PPO and POD and produce new pattern of isoenzymes; the different concentration of zymotic liquid had a different effects on the PPO and POD that were caused by the liquid; the 50 times diluted liquid had a greatly positive relation to the POD activity; and the higher concentration of the liquid had a tendency that made the PPO activity inhibition and then increase, which denoted that the liquid took a scheduled adjustment play of the PPO activity.

Key words: Polyphenol oxidase, Peroxidase, *Trichoderma harziaarum*, Induced resistant

在植物病害生防领域, 有些木霉菌株是病原菌的很好拮抗物或寄生菌^[1]。在防治白绢病 (*Sclerotium rol fsii*)、镰刀病 (*Fusarium spp.*)、立枯丝核菌病 (*Rhizoctonia solani*)、纹枯病 (*Sheath blight*) 及其它土传病害等方面均有报道^[2]。自木霉 (*Trichoderma*) 发现具有生防价值以来, 人们对其重寄生作用和拮抗成分进行了大量的研究^[3], 却忽略了本身对植物应有代谢产生的影响。采用酶活动力学扫描及垂直平板凝胶电泳, 并对喷施哈茨木霉发酵液后水稻多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 及过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性和同工酶谱带的变化进行了分析研究, 发现哈茨木霉不仅能够提高 PPO 和 POD 酶的活力, 而且还能调节产生新的同工酶谱带, 这表明木霉对植物内

* 安徽省科技厅农业重点项目 (No.1999-084)

** 联系人

收稿日期: 2002-11-14, 修回日期: 2003-03-25

在的生防系统具有重要的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株及培养基：试验菌株为哈茨木霉的 IM-6 菌株，系本生化实验室经 N⁺ 注入筛选出突变株。培养基为 PD 液体培养基。

1.1.2 试验作物：种子为“皖粳 48”，由安徽农科院提供；经培育两周的幼苗为试验作物。

1.1.3 材料的准备：将该菌株孢子接种于 PDA 液体培养基，80 r/min，摇床培养 7d，单层纱布过滤，发酵液设 5 种浓度梯度：原液及将原液分别稀释为 10、20、50 及 100 倍。100 mL/m² 喷施，重复 3 次，水作对照。

1.2 方法

1.2.1 PPO 活力的测定：(1) 试剂：0.1mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液 (pH6.0)，100mmol/L 邻苯二酚；(2) 提取：按 Taneja^[4] 等和 Jesus Rivas^[5] 等方法略作修改制备酶液。取幼苗 0.5g，剪成 1cm 大小片段，加 5mL 柠檬酸-磷酸缓冲液 (pH6.0) 和少量的石英砂，冰浴上研成匀浆，置于 4℃ 冰箱中浸提 24h 左右，间隔振荡，取 1mL 于 14000 r/min，4℃ 离心 15min，取上清液 (即为粗酶液) 测定酶活性，并 4℃ 冰箱保存便于以后进行电泳；(3) 活力测定方法：取 2mL 柠檬酸缓冲液、1mL 邻苯二酚试剂和 0.1mL 酶液混和，立即在波长 405nm 下进行扫描 3min，测 OD 值的变化，重复 3 次，将吸光值每秒钟每升高 0.001 定义为 1 个 PPO 活性单位，PPO 活性表示为 10³ ΔA/s (20℃，pH6.0)。

1.2.2 POD 活力的测定：(1) 试剂 PBS (pH 7.8)，20mmol/L 愈创木酚，40mmol/L 过氧化氢；(2) 酶液提取 取幼苗 0.3g 用 3mL 蒸馏水 (4℃) 研磨匀浆提取，14,000 r/min 离心 15min。活力单位规定同 PPO；(3) 活力测量方法 取 3mLPBS、0.05mL 愈创木酚试剂和 0.1mL 酶液混和，立即加过氧化氢 0.01mL，然后在波长 470 nm 下进行扫描 3min 并统计换算。

1.2.3 PPO 同工酶电泳：电泳按 Wisseman^[6] 方法进行，不连续非变性 PAGE 电泳，4% 的浓缩胶，7% 的分离胶，(C = 2.7%)；稳压：浓缩胶 110V，当指示剂接近分离胶时切换电压为 220V；置冰水中电泳。电极缓冲液：pH8.3 Tris-Gly 缓冲液。电泳完毕后取下胶片在柠檬酸-磷酸缓冲液中 (pH6.0) 平衡 30min，用 5% 的邻苯二酚和 0.06% 的对苯二胺染色，褐色的部位即为同工酶谱带。

1.2.4 POD 同工酶电泳：参照吴少伯^[7] 的电泳方法，浓缩胶浓度为 4%，pH 6.7，分离胶浓度为 7.5%，pH 8.8，过硫酸铵化学聚合，用溴酚蓝作指示剂，其余同 PPO。使用联苯胺染色法：联苯溶液 (40mL) : 4% 氯化铵溶液 : 5% EDTA-Na 溶液 : 0.3% H₂O₂ 溶液 : 蒸馏水 = 1:1:1:1:8-9。

表 1 多酚氧化酶活力的动态变化

天数	1	2	3	4	5	6	7
对照	2.69	2.54	2.53	2.56	2.6	2.54	2.78
原液	1.74	0.99	2.26	2.7	4.83	3.04	3.35
×10	2.54	2.01	2.28	2.88	3.83	3.4	3.14
×20	2.59	2.23	2.29	3.42	3.4	3.15	3.33
×50	2.68	2.01	2.28	3.55	3.85	4.07	3.69
×100	2.33	2.32	2.32	2.8	3.52	3.67	3.18

2 结果与分析

2.1 多酚氧化酶的活力的动态变化

酶活力变化的测定数据整理于表 1、图 1，从中可以看出，不同浓度的木霉发酵液喷施水稻幼苗后，都能对其多酚氧

化酶的活力产生影响,从酶活力动态曲线来看,在作用后第1d,第2d,其酶活力都有明显的降低,但第3d后开始回升,在第5d第6d达到最高峰,第7d后稳定在一个比对照高30%的水平上。从图1还可以看出,发酵液的浓度越大,对多酚氧化酶的活力的影响越显著,用未加稀释的发酵液处理水稻苗,其活力在48h后回落到0.99个单位,而在第5d达到4.83个单位比对照高出将近2倍。

2.2 过氧化物酶酶活的动态变化

对POD的活力变化归纳于表2,由图2可以看出,发酵液对过氧化物酶酶活的影响,从总体来看,能够提高酶的活力,其中浓度为50倍的稀释液是最佳刺激浓度,能够使酶的活力在第7d达到5.38,比对照高2.5倍。但发酵原液对过氧化物的活力有明显的抑制作用

表2 过氧化物酶活力的动态变化

天数	1	2	3	4	5	6	7
对照	2.4	2.66	2.52	2.33	2.5	2.48	2.48
原液	2.13	1.98	2.02	2.17	2.41	2.66	2.78
×10	2.35	2.98	2.82	2.07	2.78	2.53	2.92
×20	2.71	2.89	2.92	3.64	3.38	4.37	4.93
×50	2.77	3.04	3.08	4.25	4.7	4.83	5.38
×100	2.49	2.68	3.29	4.03	4.26	4.67	4.77

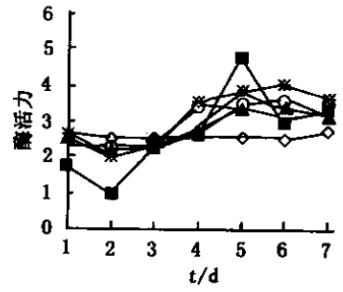


图1 木霉发酵液对多酚氧化酶活力的影响

—◇—对照, —■—原液, —▲—10倍, —×—20倍, —*—50倍, —○—100倍

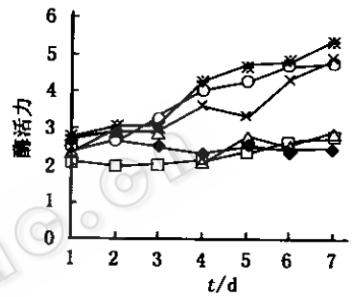


图2 木霉发酵液对多酚氧化酶活力的影响

—◇—对照, —□—原液, —△—10倍, —×—20倍, —*—50倍, —○—100倍

用,在第2d活力只有1.98,比对照2.66低出20%,需到第7d其酶活力才恢复到略高于对照水平。

2.3 多酚氧化酶的同工酶电泳

施用发酵液后PPO同工酶带谱见图3,该图为发酵原液后1~8d水稻多酚氧化酶同工酶电泳谱带。从图3可以看出,喷施发酵液24h后,其同工酶带着色明显比较淡,而其后带谱渐渐变浓,并在第7d后出现了一条 $R_f = 0.80$ 新带谱(图中箭头已标出)。

2.4 过氧化物酶同工酶电泳

POD同工酶带谱如图4。该图为喷施发酵液稀释50倍后1~7d水稻叶片过氧化物酶同工酶电泳谱带图,表明在此浓度发酵液的作用下,其同工酶带染色明显较深,并在第3d后出现了 $R_f = 0.79$ 、 $R_f = 0.82$ 的新带谱(图中箭头所示),而第1d,第2d均未见。

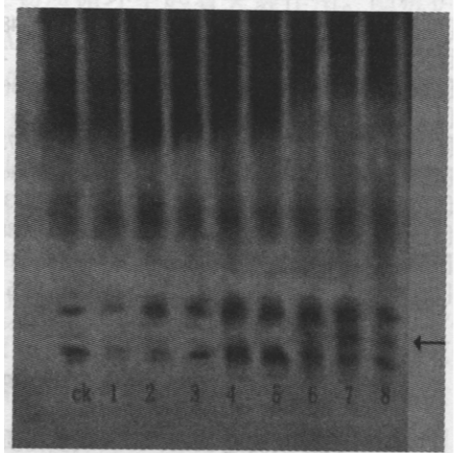


图3 施用发酵原液后水稻多酚氧化酶电泳图谱

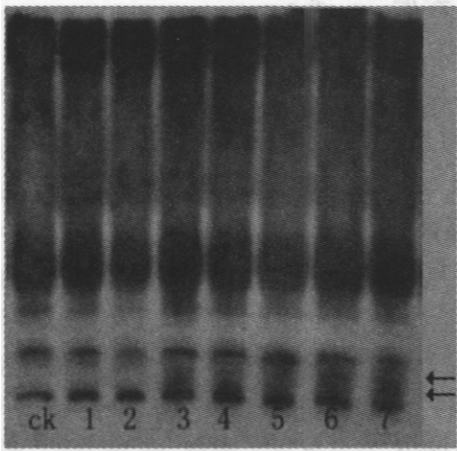


图4 施用50倍发酵液后水稻过氧化物酶电泳图谱

3 讨论

诱导抗性作用是指激活了植物本身的防御系统而使植物能够抵御病原菌或害虫的侵害。木霉对植物诱导抗性的研究在国外已有报道, Wyss 发现哈茨木霉的分离种在大豆根部产生了大量的植保素——大豆抗毒素^[8]。但并没有抑制丝核菌的侵染。Zimand^[9] 提出一个有意义的作用机制, 哈茨木霉 T₃ 能够抑制灰葡萄孢菌的果胶酶活性, 因而阻止了灰葡萄孢菌对大豆叶部的侵染, 降低了多聚半乳糖醛酸酶的活性导致了寡聚半乳糖醛酸酐的积累, 而后者能够作为植物进行防御反应的生防因子, 从而抑制了病原菌灰葡萄孢对大豆叶部的侵染。

综上所述, 哈茨木霉发酵液不仅含有促进植物生长的物质, 还含有能诱导植物内在生防系统能力的物质, PPO、POD 均为植物细胞内清除活性氧伤害的保护性酶的系统^[10]。其活性的提高有助于提高植物的抗病性。由于它不仅能够提高抗性酶基因表达产物的量, 而且还能够促使不表达的某些同工酶基因表达。故在试验中, 酶活力有一个渐渐升高的过程, 在同工酶电泳中有新的带谱增加, 但不同浓度的发酵液对植物的影响是不同的, 高浓度的发酵液对多酚氧化酶的影响较大, 先使酶的活力下降, 然后迅速上升, 进而达到一个稳定的水平。而对过氧化物酶, 最适影响浓度为稀释 50 倍, 高浓度的发酵液对其活力却有一定的抑制作用。那么, 这种抑制作用随着时间的延长渐减弱, 但是究竟是发酵液中哪一种物质成份在起作用, 这种物质又如何调节基因表达调控尚待做进一步深入研究。

参考文献

- [1] 徐 同. 真菌学报, 1996, 15 (2): 143~148.
- [2] 王艳丽, 沈 璞, 徐 同. 植物保护学报, 2000, 27 (2): 97~101.
- [3] 徐 同. 植物生理学报, 1993, 23 (1): 73~77.
- [4] Taneja S R, Sachar R C. Phytochemistry. 1974, 13: 2695~2702.
- [5] Rivas, N D J, Whitaker J R. Plant Physiol, 1973, 52: 501~507.
- [6] Wisemann K W, Montgomery M W. Plant Physiol, 1985, 78: 256~262.
- [7] 吴少伯. 植物生理学通讯, 1979, 12 (1): 30~33.
- [8] Ahmad J S, Baker R. Can of J Microbiology, 1988, 34: 807~814.
- [9] Loc T, Nelson E B, Harman R G. Plant Dis, 1996, 80: 736~741.
- [10] 李红玉, 何晨阳. 农业生物技术学报, 1996, 4 (2): 190~191