

过氧化物酶同工酶与棉花黄萎病抗性的相关研究^X

马峙英¹ 刘叔倩¹ 王省芬¹ 张桂寅¹ 孙济中² 刘金兰²

(¹河北农业大学, 河北保定 071001; ²华中农业大学, 湖北武汉 430070)

提 要 对20个来源及抗性不同的海岛棉和陆地棉品种和2个陆地棉(S)×海岛棉(R)杂交组合的亲本、F₁、F₂世代的POX同工酶研究表明, 接种黄萎病菌前后, 棉花叶片中的POX同工酶酶谱发生明显变化, 抗病品种与感病品种的阴性POX同工酶谱带均由原来的3条增至6条, 但两者之间不存在明显差异; 阳性POX同工酶谱带接种前后均只有1条(POX2PC1), 抗病品种接种前后该酶带无明显变化, 而感病品种接种后活性增强。遗传分析表明, 海岛棉对黄萎病的抗性和POX2PC1酶带基因具有显性单基因遗传特征, 并推测PC1基因受抗病基因调控, 在生化水平上进一步证明海岛棉抗性为显性单基因遗传。POX在棉花抗黄萎病中的作用并非十分重要, 但PC1酶带的表现与棉株黄萎病抗性显著相关, PC1酶带弱, 棉株抗病, PC1酶带强, 棉株感病, 从而证明POX2PC1同工酶可作为遗传标志在育种上加以利用。

关键词 棉花; 黄萎病; 抗病性; 过氧化物酶(POX); 同工酶

Relationship between Peroxidase Isozymes and Resistance to Verticillium Wilt in Cotton

MA ZhiYing¹ LU ShuQian¹ WANG XingFen¹ ZHANG GuiYin¹ SUN JiZhong²
LU Jinlan²

(¹Hubei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001; ²Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract Peroxidase (POX) isozyme patterns were investigated in the materials including P₁, P₂, F₁ and F₂ of two crosses between susceptible Upland cotton cultivars and a resistant Sea Island cotton variety, and 20 cottons belonging to *G. barbadense* and *G. hirsutum* with different levels of Verticillium wilt resistance. There were three POX isozyme bands of anode in both the susceptible and resistant cottons when no pathogen stress, and after inoculation, three new bands of anode appeared in all the materials. On the other hand, one band of cathode, named POX2PC1, was different between the susceptible and the resistant materials before inoculation, and the band of the susceptible varieties was more intensive than that of the resistant. After inoculation, the PC1 band of the resistant was still weak, but the band of the susceptible was much stronger than that of uninoculated plants. Through the analyses to the PC1 band of F₁ and F₂ populations, it was shown that almost all the bands of F₁ plants were weak, and the segregation ratios of weak and strong bands in F₂ populations were 3÷1. Since the resistance of the *G. barbadense* variety was controlled by a single gene, the PC1 band gene with the characteristic of single gene could be regulated or controlled by the resistant gene. In the F₂ generation of two combinations, it was observed that there was a significant relationship between intensiveness of PC1 band and

X 河北省自然科学基金和河北省教委博士基金资助项目

收稿日期: 1998208211, 接受日期: 1999205204

Verticillium wilt resistance, with the performance of light colored band plant showing resistant and deep colored band plants susceptible. Therefore, the POX2PC1 isozyme can be used as a genetic marker applicable to the future cotton breeding.

Key words Cotton; Resistance to Verticillium wilt; Peroxidase (POX); Isozyme

植物体内原有的或经病原菌侵染后诱导产生的一些寄主酶与植物的抗病性有密切关系。许多研究表明, 过氧化物酶(POX)参与一些植物抗病作用的生化反应事件, 且可作为鉴定寄主抗病性的指标^[1~6]。但POX同工酶与棉花黄萎病抗性的关系, 国内外尚未见报道。本研究拟对此问题进行初步探讨, 以为棉花黄萎病抗性机制和抗病遗传育种研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

选择20个来源和抗病性不同的棉花品种(表1)和2个陆地棉海岛棉杂交组合, 作为分析寄主同工酶的材料。

表1 供试棉花品种的名称、来源及黄萎病抗性反应
Table 1 Cotton varieties used and their resistance to Verticillium wilt

编号 No	棉种及品种 Species and variety	抗性反应 ³ Reaction type	编号 No	棉种及品种 Species and variety	抗性反应 ³ Reaction type
1	吐海2号 Tuhai2	R	11	唐棉2号 Tangmian2	R
2	海吉扎70 Giza70	R	12	苏2028 Su2028	R
3	岛比马90253 Pima90253	R	13	陆冀棉2号 Jimian2	S
4	棉海7124 Hai7124	R	14	中棉所8号 Zhongmiansuo8	S
5	5010夫 5010F	R	15	地鲁棉1号 Lumian1	S
6	农大9427 Nongda9427	R	16	冀棉11号 Jimian11	S
7	陆省94217 Sheng94217	R	17	棉邯208 Han208	S
8	地张仲3号 Zhangzhong3	R	18	衡9273 Heng9273	S
9	棉省557 Sheng557	R	19	冀棉8号 Jimian8	S
10	保89S225 Bao89S225	R	20	鄂荆1号 Ejing1	S

3 黄萎病反应型根据人工室内接种鉴定和田间病圃鉴定结果确定。 Reaction type of Verticillium wilt was determined by identification of growth chamber and the disease nursery in Hebei Agricultural University.

1.2 试验方法

1.2.1 棉苗培育及接种方法 采取营养钵育苗和定量注菌液接种法^[7]。接种黄萎病菌为中等致病力菌系 VJ61。

1.2.2 取样方法 分别对供试杂交组合的亲本、F₁和F₂群体的棉苗单株编号, 接种前1天和接种后7天、14天按单株编号顺序取样。每株棉苗剪取子叶0.1g装入小塑料袋中, 迅速用液氮冷冻, 转入-80℃冰箱保存。对供试的不同棉花品种, 分别在接种前1天、接种后1、4、7、10、14天取样, 每次对每品种50~55株棉苗取子叶少许, 混合后用液氮冷冻, 转置-80℃冰箱保存。

1.2.3 同工酶提取 将冷冻的叶片放入冰浴研钵中, 按每克叶片加5 mL 预冷提取液(1.0 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)研磨, 0~4℃ 10000 r/min 离心20 min, 取含酶上清液用于电泳。

1.2.4 电泳及酶带显色 采用聚丙烯酰胺等电聚焦电泳法^[8]。凝胶浓度7.0%, 胶联度

3.0%, 2.5% 两性电解质 pH 为 3.5~10.0。阳极液为 1 mol/L H₃PO₄, 阴极液为 1 mol/L NaOH, 样品点样量 10 μL。点样时, 以感病亲本的酶液作对照。电泳程序为: 4 条件下, 60 V 预电泳 30 min, 加样纸, 再 60 V 电泳 15 min, 然后恒流 12.5 mA 至电压升至 550 V, 去样纸, 最后恒压 580 V 至电流降为 0.2 mA。电泳持续 2.5 h。电泳完毕, 用醋酸联苯胺法染色^[9]。

2 结果和分析

2.1 亲本品种及杂种后代 POX 同工酶酶谱表现

2.1.1 接种前后亲本品种 POX 同工酶酶谱变化 比较抗病品种比马 90253 和感病品种鲁棉 1 号接种前后 POX 同工酶谱, 可见棉株叶片内 POX 同工酶带集中分布于正、负两极。在未接种时(图1), 不论是抗病品种比马 90253, 还是感病品种鲁棉 1 号, POX 同工酶酶谱的正极(A node)均有 3 条酶带, 其中 PA 1、PA 2 为强带, PA 3 为弱带。在负极(Cathode)都仅具有 1 条 PC1 酶带, 但感病品种鲁棉 1 号的 PC1 带明显强于抗病品种比马 90253, 而同一品种的不同个体之间无明显差异。接种后 7 天, 棉苗未出现明显病症, 但 2 个亲本品种叶片的 POX 同工酶谱已发生明显变化(图2), 二者在正极原有的 3 条酶带都有不同程度的加强, 其中 PA 3 由弱带变为强带。此外, 正极还出现 3 条新的酶带, 即 PA 4、PA 5、PA 6, 其中 PA 4、PA 5 较强, 而 PA 6 较弱。在负极, 仍只有 1 条酶带, 抗病品种比马 90253 仍表现为弱带, 而感病品种鲁棉 1 号的 PC1 带比接种前颜色加深, 变为更强的酶带。同工酶带等电点测定表明, PA 1、PA 2、PA 3、PA 4、PA 5、PA 6 的 pI 值分别为 3.8、4.1、4.3、4.5、4.7、4.9; PC1 的 pI = 8.0。

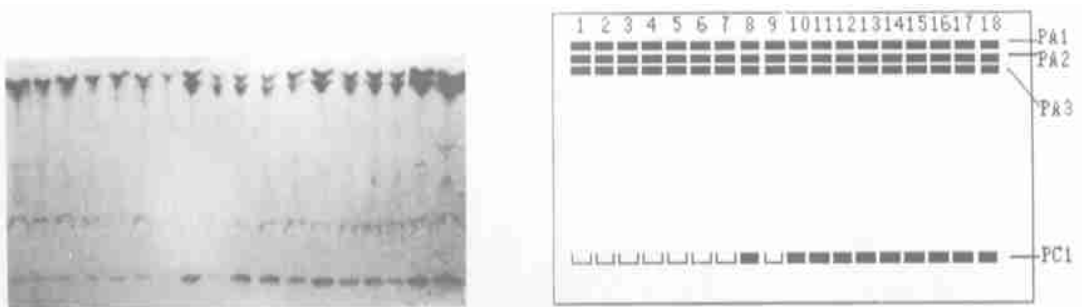


图1 接种前抗、感品种个体的 POX 同工酶酶谱

Fig 1 POX isozyme patterns of individuals in Pima 90253 (R) and Luminian 1 (S) before inoculation

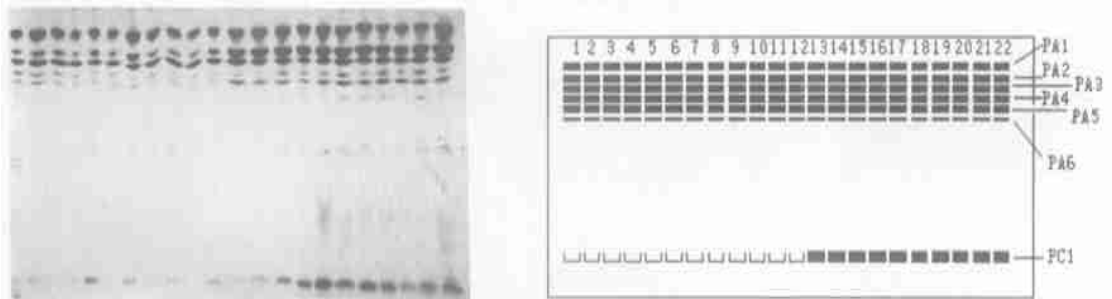


图2 接种后抗、感品种个体的 POX 同工酶酶谱

Fig 2 POX isozyme patterns of individuals in Pima 90253 (R) and Luminian 1 (S) after 7 days of inoculation

由上述结果可见, 抗、感品种之间 POX 同工酶谱的正极酶带数及其强弱, 在接种前和接

种后均无明显差异,而负极的PC1酶带(POX2PC1),在接种前感病品种强于抗病品种,接种后二者差异更加明显,表明POX2PC1酶带可能与品种的黄萎病抗性有关。

2.1.2 抗、感品种杂种后代POX同工酶带及黄萎病抗性的遗传分析 以感 δ 抗杂交组合鲁棉1号 δ 比马90253的F₁、F₂为材料,在接种后7天按单株编号取样,测定了个体的POX同工酶。结果发现,F₁、F₂所有个体的正极酶带均无差异,而F₁负极PC1酶带均表现为弱带,F₂群体中出现PC1弱带和强带的分离。对该组合F₂群体中PC1弱带植株与强带植株分离比例的遗传测验表明,弱带型植株与强带型植株的分离比例均符合3 \div 1(表2),可见PC1酶带为弱带型这一性状具有显性单基因遗传特征。用另一组合中棉所8号 δ 比马90253的F₁、F₂进行的试验也得到类似的结果。

表2 2个杂交组合F₂群体接种后POX-PC1酶带的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of POX-PC1 band in F₂ population from two crosses

组合 Combination	总株数 Total plant	弱带株数 No. of P ³	强带株数 No. of p ³	实际比例 Observed ratio	期望比例 Expected ratio	χ^2	概率 Probability
Lumian 1 δ Pima90253	108	82	26	3.15 \div 1	3 \div 1	0.01	> 0.90
Zhongmiansuo8 δ Pima90253	57	45	12	3.67 \div 1	3 \div 1	0.29	0.50~0.75

3 P—弱带棉株, p—强带棉株, P—plant with light colored PC1 band; p—plant with deep colored PC1 band

对上述2个杂交组合F₁、F₂代黄萎病抗性的遗传分析(表3)表明,抗病基因呈显性单基因遗传。结合前述结果,推测POX2PC1酶带基因可能受抗病基因调控。

表3 2个杂交组合后代的黄萎病抗性遗传分析

Table 3 Genetic analysis of two crosses between susceptible and resistant parents

组合 Combination	世代 Generation	总株数 Total plant	抗病株数 No. of R ³	感病株数 No. of S ³	实际比例 Observed ratio	期望比例 Expected ratio	χ^2	概率 Probability
Lumian 1 δ Pima90253	F ₁ F ₂	20 108	20 79	0 29	2.72 \div 1	3 \div 1	0.31	0.50~0.75
Zhongmiansuo8 δ Pima90253	F ₁ F ₂	44 57	39 39	5 18	2.17 \div 1	3 \div 1	0.98	0.25~0.50

3 R—抗病棉株, S—感病棉株, R—resistant plant; S—susceptible plant

2.2 POX-PC1酶带与棉花黄萎病抗性的相关分析

从以上分析中得知,POX2PC1酶带与棉花黄萎病抗性间可能存在遗传上的相关性。如果这种遗传相关确实存在,则无论是纯系品种群体,还是杂种后代个体,都必然是PC1为弱带时表现为抗病,PC1为强带时表现为感病,反之,亦是如此。基于此,以20个抗、感不同的纯系品种和2个杂交组合的F₂分离群体为材料,对POX2PC1酶带与棉花黄萎病抗性的关系作进一步分析和验证。

对20个抗、感不同的棉花纯系品种接种前后POX同工酶酶谱的比较研究表明,接种前,12个抗病品种的PC1酶带均较弱,其中5个海岛棉品种(1-5)的酶带比7个陆地棉品种(6-12)的酶带还弱些;而8个感病品种的PC1酶带都较强(图3)。接种后7天测定,抗病海岛棉和陆地棉品种的PC1酶带均明显比所有感病品种(13-20)的PC1酶带弱。品种的POX2

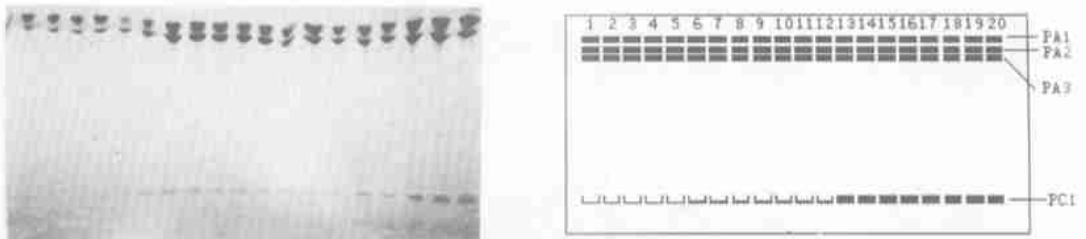


图3 接种前20个棉花品种 POX 同工酶酶谱

Fig 3 POX isozyme patterns of 20 cottons before inoculation

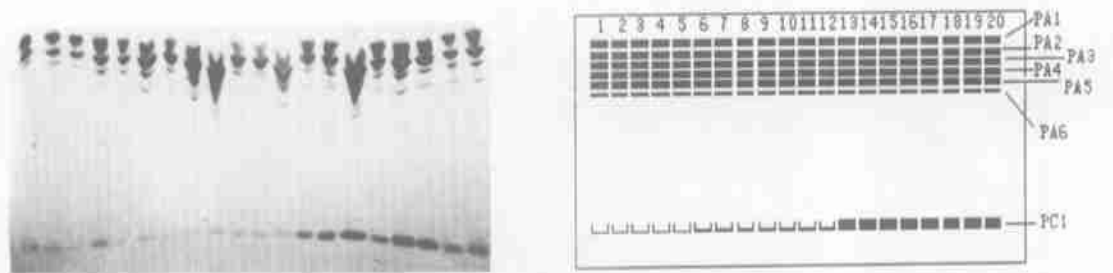


图4 接种后20个棉花品种 POX 同工酶酶谱

Fig 4 POX isozyme patterns of 20 cottons before inoculation

PC1酶带强弱与黄萎病抗性相关符合率达100% (图4)。

进一步对2个杂交组合分离群体的单株 PC1 酶带与其黄萎病抗性的对应关系分析表明,在中棉所8号δ比马90253组合的57个棉株个体中, PC1为弱带且抗病的个体38株, PC1为强带且感病的个体11株, PC1酶带强弱与棉株黄萎病抗性相关符合率达85.96%; 在鲁棉1号δ比马90253组合的108个棉株中, 弱带、抗病的77株, 强带、感病的24株, 符合率为92.52% (表4), 2个组合平均符合率为89.24%。这表明 PC1酶带与黄萎病抗性之间确实存在高度的遗传相关。

以2个海岛棉品种(吐海2号和比马90253)、2个陆地棉抗病品种(唐棉2号和苏2028)和2个感病品种(邯208和衡9273)为材料, 测定比较了接种前后 POX 同工酶的动态变化, 发现不论是海岛棉抗病品种还是陆地棉抗病品种, 接种前1天和接种后1、3、7、10、14天的 PC1酶带均为弱带, 且无明显变化, 而感病品种的 PC1酶带在不同时间均为强带, 只是接种后比接种前有所增强。这表明 PC1酶带的表达不存在显著的时间特异性, 而是与品种的黄萎病抗性密切相关。

3 讨论

本研究发现, 抗、感棉花材料接种黄萎病菌后, 阴性 POX 同工酶(正极酶带)较接种前都发生明显变化, 但抗、感材料间无明显差别。而阳性 POX 同工酶(负极酶带)的 PC1酶带在抗、感材料间存在明显差异, 表明这一酶带与棉花的黄萎病抗性有很高的相关性。抗病材料 PC1酶带弱、活性低, 接种前后无明显变化; 感病材料 PC1酶带强、活性高, 接种后比接种前明显增强。由于抗病材料的 PC1酶带表现为弱带而不是无带, 所以编码该酶带的基因在抗、感材料中都存在, 是组成型的, 只是存在表达速度与表达量上的差异。

表4 鲁棉1号 \times Pima90-53 F₂单株 POX-PC1酶带与抗病性之间的对应关系Table 4 The relationship between POX-PC1 band and resistance of F₂ individuals from Lum in1 \times Pima90-53

植株编号 Plant No.	PC1酶带 L or D ³	抗病性 R or S ³	植株编号 Plant No.	PC1酶带 L or D ³	抗病性 R or S ³	植株编号 Plant No.	PC1酶带 L or D ³	抗病性 R or S ³	植株编号 Plant No.	PC1酶带 L or D ³	抗病性 R or S ³
1	L	S	28	D	S	55	L	R	82	L	R
2	D	S	29	D	S	56	L	R	83	L	R
3	L	R	30	D	S	57	L	R	84	D	S
4	D	S	31	L	R	58	L	R	85	L	R
5	L	R	32	L	R	59	L	R	86	L	R
6	D	S	33	D	S	60	D	S	87	L	R
7	L	R	34	L	R	61	D	S	88	L	R
8	L	R	35	L	R	62	L	R	89	L	R
9	L	R	36	L	R	63	D	S	90	L	R
10	L	R	37	D	S	64	L	R	91	L	R
11	D	S	38	D	S	65	L	R	92	L	R
12	L	R	39	D	S	66	L	R	93	L	S
13	D	S	40	L	R	67	L	R	94	L	R
14	L	R	41	L	R	68	L	R	95	L	R
15	L	R	42	L	R	69	D	R	96	L	R
16	L	R	43	L	S	70	L	R	97	L	R
17	L	R	44	L	R	71	D	S	98	D	S
18	D	S	45	L	R	72	D	S	99	L	S
19	L	R	46	L	R	73	L	R	100	L	R
20	L	R	47	L	R	74	L	R	101	L	R
21	L	R	48	L	R	75	L	R	102	L	R
22	L	R	49	L	R	76	L	R	103	L	R
23	L	R	50	D	S	77	L	R	104	L	R
24	L	R	51	L	R	78	L	R	105	L	R
25	D	R	52	L	R	79	D	S	106	L	R
26	L	R	53	L	S	80	L	R	107	L	R
27	D	S	54	L	R	81	L	R	108	D	S

3 L 表示弱带, D 示强带; R 示抗病, S 示感病。

L²light colored band, D²deep colored band; R²resistant plant, S²susceptible plant

通过对 PC1 酶带弱、抗病的品种与 PC1 酶带强、感病的品种间杂交后代的分析, 进一步证明了 PC1 酶带与黄萎病抗性间的高度相关性, 还预示这种相关性的原因, 可能是抗病基因对 PC1 酶基因的表达有抑制作用。在抗病品种中, 由于受抗病基因产物的抑制, PC1 基因关闭或微弱表达, PC1 呈弱带; 而感病品种不存在抗病基因, PC1 基因自由表达, 表现为强带。在杂交 F₁ 中, 若按同工酶具有共显性的特点^[10], PC1 酶带的活性应该是抗、感亲本该酶带活性的叠加, 表现为强带。但试验结果证明 PC1 酶带仍表现为弱带, 说明 F₁ 杂合体中具有显性抗病基因仍起抑制 PC1 酶基因表达的作用。F₂ 个体弱带一般表现为抗病, 强带一般表现为感病, 亦证明抗病基因与 PC1 基因密切相关。

抗病基因对 PC1 基因的抑制作用在接种前后不发生变化, 由此推论, PC1 基因不是主要的棉花抗黄萎病的防卫反应基因。在接种后, 抗、感品种正极的阴性 POX 同工酶都出现 3 条新的酶带, 原有的 3 条酶带也有不同程度的加强。这些同工酶的等电点非常接近, 在 3.8~4.9 之间。由于抗、感品种这些同工酶的变化规律基本一致, 因而推测它们的表达与抗病基因无

关, 而可能是在受到病菌侵染时, 由病菌细胞壁的某些成分或毒素激发而产生^[2]。有的研究表明, 阴性 POX 同工酶与木质素的合成有关^[2]。诱导木质化作为一种抗病机制, 在植物抗病反应中可起到一定作用, 但木质素并不总是有效的抗侵入和抗扩展屏障^[2]。本研究结果似乎也支持这一观点, 否则, 感病品种就不会由于大量合成 POX 2PC1 同工酶而加强木质化作用最终又表现为感病。

从本研究结果可见, PC1 酶带可以作为一种遗传标记在棉花育种中加以利用, 如用于种质资源的抗性鉴定、亲本选择、分离世代抗病单株的筛选等, 可以缩短抗性鉴定周期, 提高选择效率, 加快育种进程。检测 PC1 同工酶, 技术简便, 成本不高, 电泳所需酶液量少 (10~15 μ L), 只需剪取少许叶片提取即可, 并不影响棉苗正常生长。为保证结果更为准确可靠, 也可在接种后 (如 7 天) 再行鉴定。即使如此, 也较常规鉴定提早 20~25 天完成。

参 考 文 献

- 1 王立新, 苏青. 华北农学报, 1996, 11(1): 30~35
- 2 董汉松主编, 植物诱导抗病性——原理和研究. 北京: 科学出版社, 1995. 160~170
- 3 桂美祥, 黄维玉, 倪楠君. 西北植物学报, 1992, 12(3): 173~179
- 4 徐朗莱, 叶茂炳, 徐雍皋等. 植物病理学报, 1991, 21(4): 285~289
- 5 Collinge, D. B. *Plant Mol Biol*, 1987, 9: 389~410
- 6 Qinghua Pan, Ling Wang, Hiroshi Ikehashi et al. *Phytopathology*, 1996, 86(10): 1071~1075
- 7 马峙英, 王省芬, 张桂寅等. 棉花学报, 1997, 9(1): 15~20
- 8 宋晓轩, 朱荷琴, 邢金松. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 45~48
- 9 王秀芬. 河北农业大学学报, 1990, 13(4): 78
- 10 张维强, 唐秀芝编著. 同工酶与植物遗传育种. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 71~93