

青枯菌接种的2个花生抗感品种中几种酶活性的变化

王辉¹,严海燕¹,黄家权²,叶小文²,文奇根²,廖伯寿²

(¹中南民族大学生命科学院,武汉 430074;

²中国农业科学院油料作物研究所/农业部油料作物重点实验室,武汉 430062)

摘要:为给花生的抗病育种提供理论基础,用不同浓度的青枯菌接种2个抗感花生品种,分5个时期收获样品,用分光光度计法测量酶活性。感病品种的4种酶活性前期升高,而后期下降。而抗病品种的酶活性前期升高缓慢,后期升高速度越来越快。前期抗病品种酶活性不是都高于感病品种,后期抗病品种的酶活性则都高于感病品种。对照组2个品种花生的酶活性始终变化不大,它们之间酶活性也没有明显差异。PAL、CAT、PPO和POD作为植物的保护性酶类均参与了病程反应,其表达模式的差异可能与花生的青枯病抗性密切相关。

关键词:花生;抗感品种;酶活性

中图分类号:S435.29

文献标志码:A

论文编号:2011-0968

The Study on Changes of Enzymes Activities in Resistant and Susceptible Cultivars of Peanut after *Ralstonia solanacearum* Inoculation

Wang Hui¹, Yan Haiyan¹, Huang Jiaquan², Ye Xiaowen², Wen Qigen², Liao Boshou²

(¹College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074;

²Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/

Key Laboratory of Oil Crop Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

Abstract: In order to provide theoretical guidance for resistant disease breeding of peanut, resistant and susceptible cultivars of peanut were vaccinated by *Ralstonia solanacearum* with different concentrations, the samples were collected in five periods, and enzymatic activities were measured by spectrophotometer method. The activities of 4 enzymes in susceptible cultivars increased in earlier stage, but declined in later stage. Enzymatic activities of resistant cultivars increased slowly in earlier stage, but increased more and more rapidly in later stage. Not all of the 4 enzymatic activities of resistant cultivars were higher than that of susceptible cultivars in earlier stage, but all of enzymatic activities of resistant cultivars were higher than that of susceptible cultivars in later stage. Changes of enzymatic activities in the control groups were not obvious, and the differences of enzymatic activities in two cultivars were not significant too. PAL, CAT, PPO and POD as protective enzymes participated in the course reaction, their expression pattern differences were closely related with *Ralstonia solanacearum* resistance of *Arachis hypogaea* probably.

Key words: peanut; resistant and susceptible cultivars; enzymatic activities

0 引言

花生(*Arachis hypogaea* L.)是世界范围内广泛栽

培和种植的经济作物,在中国的产量和产值均居世界之首,“十一五”期间的年均种植面积500万hm²,年均

基金项目:国家花生产业技术体系(CARS-14);公益性行业(农业)科研专项(200903004)。

第一作者简介:王辉,男,1983年出生,河南开封人,硕士在读,研究方向:花生育种。通信地址:430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路2号 中国农业科学院油料作物研究所, E-mail: jieriniaov10@163.com。

通讯作者:廖伯寿,男,1963年出生,四川临水人,研究员,研究方向:花生遗传育种。通信地址:430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路2号 中国农业科学院油料作物研究所, Tel: 027-86812725, E-mail: lboshou@hotmail.com。

收稿日期:2011-04-02,修回日期:2011-05-11。

总产逾 1400 万 t, 为中国农民的创收以及保证国内食用油供给提供了保障。随着农业结构的调整和人民生活中膳食结构的改善, 中国花生需求量将进一步上升, 花生产业面临着良好的发展机遇。但是一些重要病害的流行严重制约了中国花生产业的发展, 其中广东、福建、江西、湖北等主产区自 20 世纪 60 年代以来流行的青枯病, 是影响花生生产最重要的细菌性病害^[1]。

植物青枯菌属原核生物界(Prokaryotae)之变形菌门(Proteobacteria)之伯克氏菌科(Burkholderiaceae)之雷尔氏菌属(*Ralstonia*)。青枯菌 [*Ralstonia solanacearum* (Rs)]广泛分布于世界, 且其寄主范围很广, 因为它具有高度的可变性。它的寄主范围遍及 54 个科的 450 余种植物^[2], 青枯菌可从植物根部或茎部的伤口侵入, 直接进入导管系统, 也可从正常的次生根的根冠部位侵入^[3]。

青枯菌与寄主植物的互作过程中, 植物体内苯丙氨酸解氨酶(PAL)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)等保护酶与植物抵抗病原菌入侵有密切关系^[4-5]。

许多植物受到伤害之后, 都有酚类化合物的浓度增加^[6]。植物细胞内存在的清除自由基的酶保护系统, SOD、CAT、POD 是该系统中的重要组成部分^[7-9], 减轻了自由基对生物大分子降解破坏及对生物膜的损伤^[10]。PPO 能催化合成多元酚^[11], 也可催化单元酚和二元酚等多元酚到联苯酚的羟基化^[12], 并产生毒性更强的醌类化合物^[11]。PPO、PAL 和 POD, 尤其是 PPO 和 POD, 还参与了木质素的合成, 与组织的木质化反应有关^[13]。

现在关于青枯菌的研究多且广, 但关于青枯菌引起植物酶活性变化的研究不多, 关于花生感染青枯病研究则更少。鉴于青枯菌对花生侵害的生物化学机制动态过程不太了解, 且酶活性与植物抗性的密切关系, 故对花生酶活性的研究势必有助于筛选花生的抗性品种。也为花生抗性的分子生物学研究及花生对青枯菌抗性与花生其他主要性状之间的相关性作铺垫。

1 材料和方法

1.1 青枯菌菌液的制取

将青枯菌侵染的花生植株的根浸泡于灭菌的 ddH₂O 中, 至其混浊, 制备 OD₆₀₀ 为 0.5 和 0.1 两个浓度。

1.2 青枯菌的接种及取样

土培‘远杂 9102’(抗病)和‘中花 8 号’(感病)2 品种花生至三叶期, 然后于主茎第 1 分蘖处下方注射 20 μL 已制取的青枯菌菌液, 另外注射灭菌的 ddH₂O 作对照。分别于接种后的第 5、7、10、12 和 14 天取样, 取

样部位为主茎第 1 分蘖处到第 2 分蘖处之间的茎。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 酶液提取 取 0.05 g 材料, 液氮破碎。以 500 μL pH 8.0 的磷酸缓冲液(0.05 mol/L, 加 1% PVP)提取。

1.3.2 PAL 测定法 20 μL 酶液、380 μL pH 8.8 的硼酸缓冲液(0.1 mol/L, 内含 5 mmol/L 的巯基乙醇, 1 mmol/L 的 EDTA)和 100 μL/L 苯丙氨酸溶液反应, 对照反应以等体积 ddH₂O 代替酶液。水浴 37°C, 计时 30 min。加 20 μL 6 mol/L HCl 终止反应。测量 A290 nm OD 值。

1.3.3 CAT 测定法 20 μL 酶液、280 μL pH 8.0 的磷酸缓冲液(0.05 mol/L)和 200 μL 过氧化氢(0.1 mol/L)。对照反应以等体积 ddH₂O 代替酶液。测量 A240 nm OD 值, 每 15 s 测一次, 计时 3 min。

1.3.4 PPO 测定法 10 μL 酶液、190 μL pH 5.5 磷酸缓冲液(0.2 mol/L)和 100 μL 邻苯二酚(0.1 mol/L), 对照反应以等体积 ddH₂O 代替酶液。测量 A416 nm OD 值, 每 15 s 测一次, 计时 3 min。

1.3.5 POD 测定法 50 μL 酶液、150 μL pH 5.4 磷酸缓冲液(0.2 mol/L), 100 μL 的愈创木酚(0.05 mol/L)和 50 μL 0.3% 过氧化氢。对照反应以等体积 ddH₂O 代替酶液。测量 A470 nm OD 值, 每 15 s 测一次, 计时 3 min。

2 结果与分析

2.1 ‘中花 8 号’和‘远杂 9102’0.1 浓度下 PAL 变化

由图 1 看出, 接种青枯菌 A600 OD 为 0.1 浓度时, ‘中花 8 号’和‘远杂 9102’2 个品种花生的 PAL 活性在第 5~7 天均无明显变化。而‘中花 8 号’PAL 活性到第 10 天后出现了忽然上升, 而到第 12 天出现了忽然下降的态势。‘远杂 9102’的 PAL 活性则从第 7 天后逐渐上升。而对照组 2 个品种的 PAL 活性始终无明显变化。

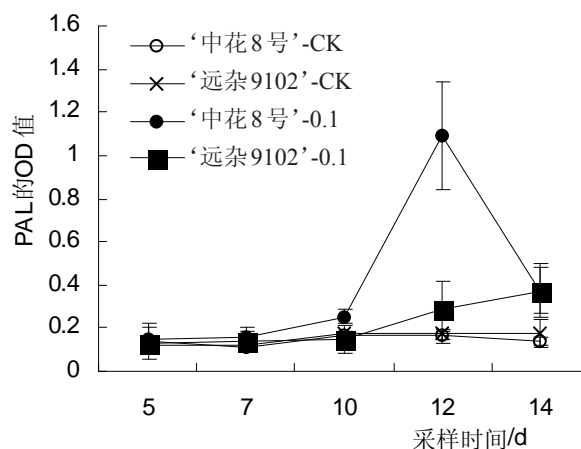


图 1 ‘中花 8 号’和‘远杂 9102’0.1 浓度下 PAL 变化

2.2 ‘中花 8 号’和‘远杂 9102’0.5 浓度下 PAL 变化

由图 2 看出, 接种青枯菌 A600 OD 为 0.5 浓度的情

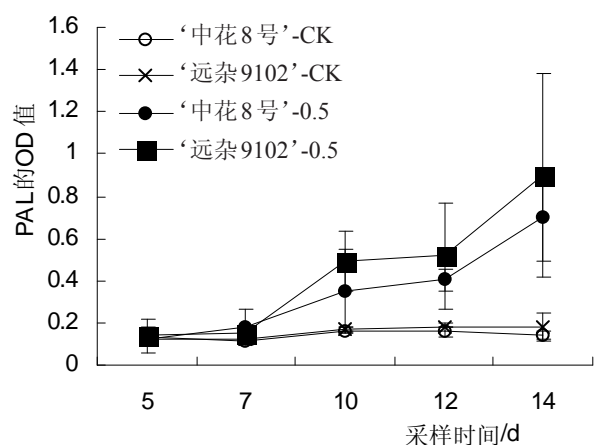


图2 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下PAL变化

况下,‘中花8号’和‘远杂9102’2个品种的PAL活性均逐渐上升,且‘远杂9102’的PAL活性高于‘中花8号’的PAL活性。而对照组花生的PAL活性始终无明显变化。

2.3 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下CAT变化

由‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下CAT变化(图3)看出,接种青枯菌A600 OD为0.1浓度的情况下,‘中花8号’CAT活性到第10天出现峰值。‘远杂9102’的CAT活性则逐渐上升。而对照组2个品种花生的CAT活性始终无明显变化。

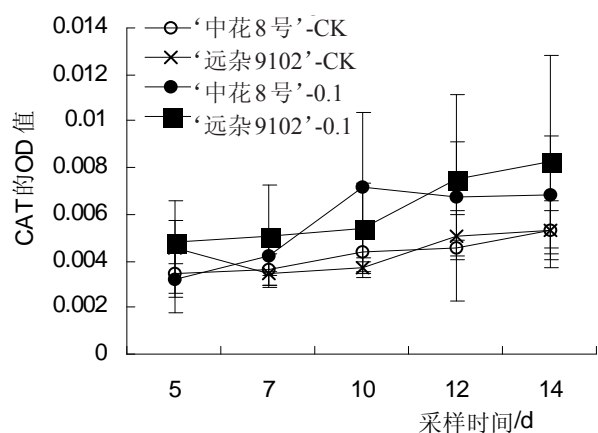


图3 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下CAT变化

2.4 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下CAT变化

由图4看出,接种青枯菌A600 OD为0.5浓度的情况下,‘中花8号’CAT活性到第12天出现峰值。‘远杂9102’的CAT活性则逐渐上升,且第12天到第14天上升趋势忽然变大。而对照组2个品种的CAT活性始终无明显变化。

2.5 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下PPO变化

由图5看出,接种青枯菌A600 OD为0.1浓度的情

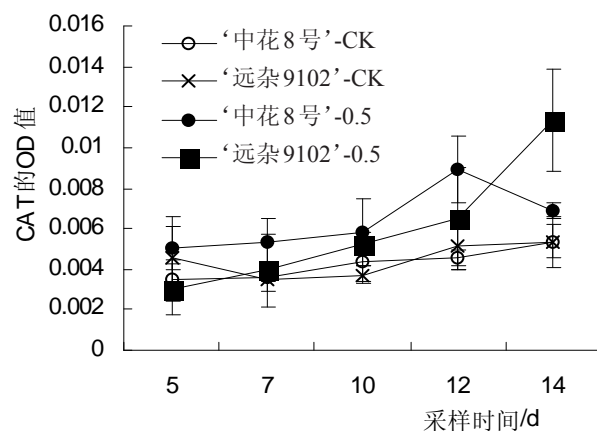


图4 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下CAT变化

况下,‘中花8号’PPO活性到第12天出现峰值。‘远杂9102’的PPO活性则逐渐上升,且第10天到第14天上升趋势忽然变大,且PPO活性最终超越了‘中花8号’。而对照组2个品种的PPO活性始终无明显变化。

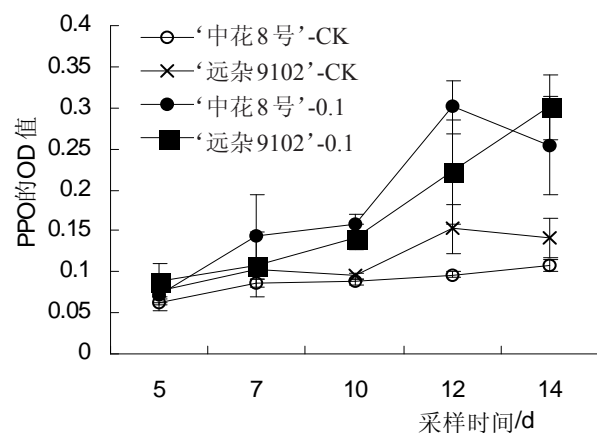


图5 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下PPO变化

2.6 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下PPO变化

由图6看出,接种青枯菌A600 OD为0.5浓度的情

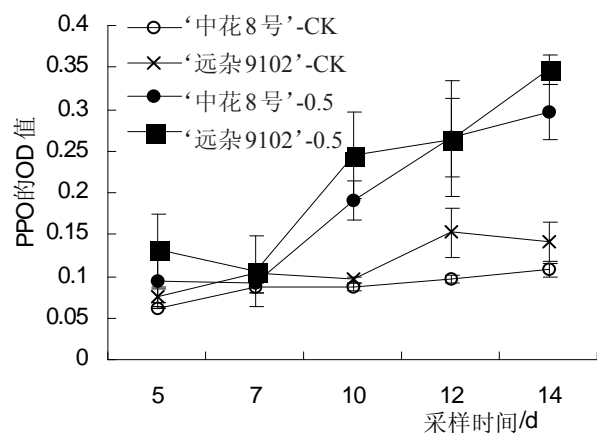


图6 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下PPO变化

况下,‘中花8号’和‘远杂9102’的PPO活性在第7天出现谷值。而后‘中花8号’和‘远杂9102’的PPO活性则逐渐上升,且‘远杂9102’的PPO活性一直高于‘中花8号’。而对照组2个品种的PPO活性始终无明显变化。

2.7 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下POD变化

由图7看出,接种青枯菌A600 OD为0.1浓度的情况下,‘中花8号’POD活性到第12天出现峰值。‘远杂9102’的POD活性则逐渐上升,且第10天到第14天上升趋势逐渐变大,且POD活性最终超越了‘中花8号’。而对照组2个品种的POD活性始终无明显变化。

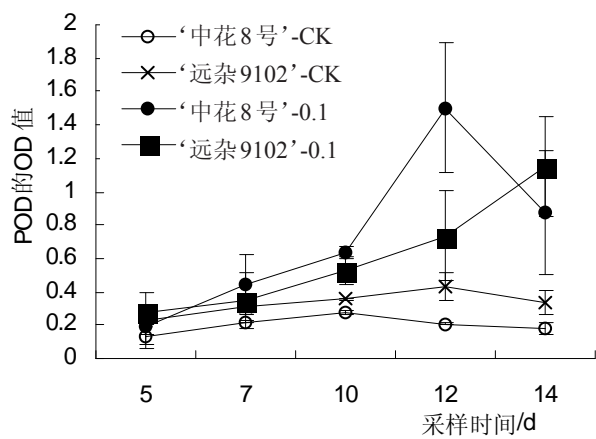


图7 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下POD变化

2.8 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下POD变化

由图8看出,接种青枯菌A600 OD为0.5浓度的情况下,‘远杂9102’的POD活性在第7天出现谷值。而后‘中花8号’和‘远杂9102’的POD活性则逐渐上升,且‘远杂9102’的POD活性一直高于‘中花8号’。而对照组两品种的POD活性始终无明显变化。

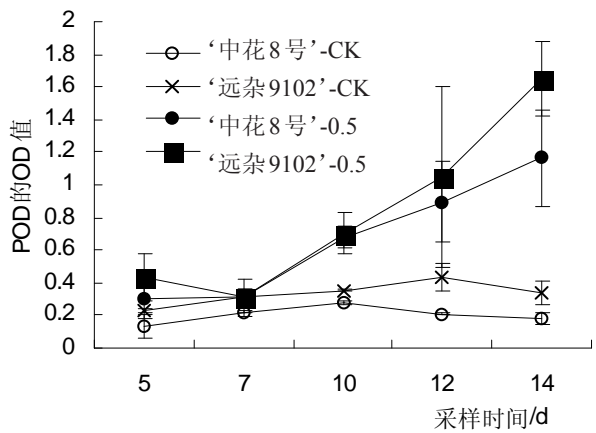


图8 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下POD变化

2.9 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下蛋白质含量变化

由图9看出,接种青枯菌A600 OD为0.1浓度的情况下,‘中花8号’蛋白质含量到第12天出现峰值。‘远杂9102’的蛋白质含量则在第10天逐渐上升,且蛋白质含量最终超越了‘中花8号’。而对照组2个品种的蛋白质含量始终无明显变化。

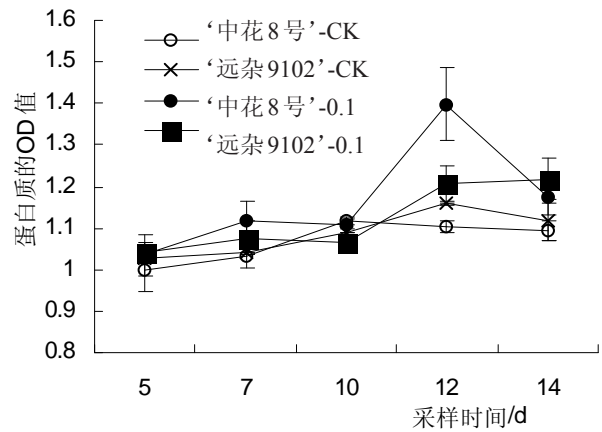


图9 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.1浓度下蛋白质含量变化

2.10 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下蛋白质含量变化

由图10看出,接种青枯菌A600 OD为0.5浓度的情况下,‘中花8号’和‘远杂9102’的蛋白质含量则逐渐上升。且‘远杂9102’的蛋白质含量一直高于‘中花8号’。而对照组2个品种的蛋白质含量始终无明显变化。

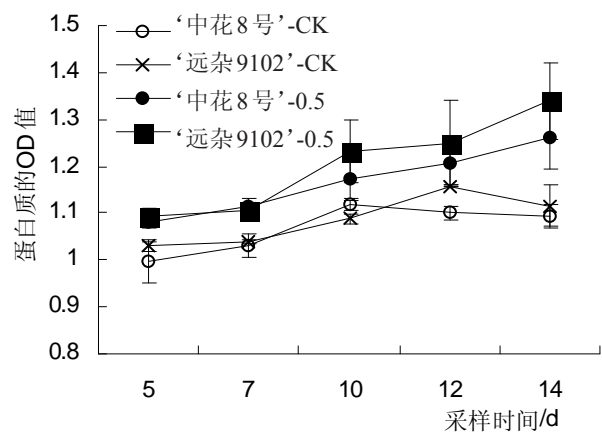


图10 ‘中花8号’和‘远杂9102’0.5浓度下蛋白质含量变化

3 讨论

谢世勇等^[14]对甘薯做类似的实验显示,抗病品种与感病品种的PAL和POD酶活性出现一个峰值,但抗病品种的酶活性一直高于感病品种,此与本实验不

同。寿森炎等^[15]对番茄做类似的实验显示,抗病品种的PAL、POD和SOD的最终活性高于感病品种,但其变化曲线复杂波折,这与本实验不符。

本实验总结规律如下:(1)本实验为温室栽培,自然环境的影响因素相对较少,所以自然栽培下的数据有待核实;(2)分光光度计法的测量受到的影响因素很多,故本实验的误差难免;(3)酶活性的计算方法和处理方法尚没有标准,所以下一步可以考虑用不同的数学度量手段对已有数据进行不同角度的诠释;(4)基于本实验的分子生物学实验还有待验证。

4 结论

感病品种的多种酶活性总是先于抗病品种升高,然后下降,即感病品种对青枯菌的敏感性高于抗病品种;感病品种的酶活性升高速度及升高速度的变化率要高于抗病品种;对照组中酶活性变化的差异不大,即感病品种与抗病品种的无病植株的酶活性差异不大;抗病品种的酶活性后期要高于感病品种,即抗病性与关键酶的酶活性相关。

参考文献

- [1] 吕建伟.青枯菌诱导的花SSH文库构建及分析[D].武汉:中国农业科学院油料作物研究所,2010.
- [2] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2007(71):6790-6801.
- [3] 袁宗胜.青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)粗毒素在花生品种抗病性鉴定中的应用[D].福州:福建农林大学,2002.
- [4] Schneider S, Ullrich W. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*,1994,45:291-304.
- [5] Ahigoy P, Felix G, Mettraux J, et al. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* × *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of B-1, 3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*,1992,41:11-21.
- [6] 康乐.植物对昆虫的化学防御[J].*植物学通报*,1995,12(4):22-27.
- [7] 赵可夫,毓崎,李德全.盐分和水分胁迫对盐生和非盐生物生理细胞过氧化作用的效应[J].*植物学报*,1993,35(7):519-525.
- [8] 吴建慧,杨玲.低温胁迫下玉米幼苗叶片活性氧的产生及保护酶活性的变化[J].*植物研究*,2004,24(4):486-499.
- [9] 齐曼·尤努斯.盐胁迫对大米沙刺膜脂过氧化和保持本科活性的变化[J].*植物研究*,2005,22(4):503-507.
- [10] 朱新华,梁军,李春玲.不同浓度Na₂SO₃处理对天竺葵活性氧化代谢及保护酶活性的影响[J].*安徽农业科学*,2006,17:4236-4248.
- [11] Rhodes J M, Wooltorton L S C, Kahl G. *Biochemistry of Wounded Plant Tissues*[J]. Berlin:de Gruyter,1978:243-286.
- [12] Peter W T, Ian B D. Polyphenol oxidase in potato[J]. *Plant Physiol*, 1995(109):525-531.
- [13] 李玉泉,宋占午,金祖荫.朱砂叶螨危害初期豇豆幼苗叶片PPO、PAL及POD的研究[J].*西北师范大学学报*,2003(3):61-64,67.
- [14] 谢世勇,卢同,李本金,等.苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶与甘薯抗青枯病的关系[J].*福建农业学报*,2003,18(4):236-238.
- [15] 寿森炎,冯壮志,殷一平,等.番茄抗感青枯病品种的生理生化差异[J].*浙江大学学报:农业与生命科学版*,2005,31(5):550-554.