

## 黄萎病菌毒素诱导棉花愈伤组织中 POD, SOD 活性和 PR 蛋白的变化

李颖章 韩碧文

(中国农业大学生物学院)

简桂良

(中国农业科学院植保所)

**摘要** 对不同抗、感病品种棉花愈伤组织在黄萎病菌毒素诱导下, 体内过氧化物酶和 SOD 活性的变化进行了测定, 结果表明, 感病品种中 POD 活性的升高大且早于抗病品种; 感病品种 SOD 活性随诱导时间延长而迅速下降, 耐、抗病品种 SOD 活性的降低较慢; 随着病菌毒素诱导时间的增加, 在电泳凝胶透射扫描系统中愈伤组织中有数种病原相关蛋白(PR 蛋白)表达。

**关键词** 黄萎病菌; 棉花愈伤组织; 过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 病原相关蛋白

**分类号** S432.23; Q946.5

## Verticillium dahliae Toxin Induced Changes in the Activities of Peroxidase and SOD and in the Expression of PR Proteins in Cotton Callus

Li Yingzhang Han Biwen

(College of Biology, CAU)

Jian Guiliang

(Institute of Plant Protection, CAAS)

**Abstract** The callus of cotton varieties with different resistance to cotton verticillium wilt pathogen were inoculated with VD-toxin of *Verticillium dahliae*. The activities of peroxidase (POD) and SOD in them were examined before inoculated and at different days after inoculation. The results showed that the increase of POD activity was earlier and higher in susceptible varieties than in resistant ones. The decrease of SOD activity was greater in susceptible varieties than that in resistant ones. Pathogenesis-related proteins (PR proteins) were induced in the callus after inoculation.

**Key words** *Verticillium dahliae*; callus of cotton; POD activities; SOD; PR proteins

黄萎病菌毒素(VD-toxin)是引起棉花黄萎病的主要致病因子<sup>[1,2]</sup>。因此,研究毒素引起不同抗性品种棉花体内的物质变化是揭示棉花抗黄萎病机理的基础。过氧化物酶(POD)与植物的抗病性密切相关<sup>[2,3]</sup>,在马铃薯、烟草、黄瓜中均发现POD在病原菌侵染后活性明显增加<sup>[4,5]</sup>。POD在植物抗病性中的作用与细胞壁的加固有关,有报道在病原菌侵染后POD在细胞壁多聚物的交联反应中起作用<sup>[6]</sup>。最近,Smith<sup>[7]</sup>证实,在黄萎病菌细胞壁碎片的诱导下,棉花抗黄萎病菌与木质素多聚物积累的时间和强度有关。超氧化物歧化酶(SOD)作为抗氧化系统酶类而起作用,有报道SOD酶与棉花品种抗黄萎病之间有相关性<sup>[5,8]</sup>。自从在烟草中发现有

收稿日期: 1999-09-21

李颖章,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

PR 蛋白(pathogenesis-related proteins)以来,陆续在 20 多种植物中检测到 PR 蛋白<sup>[9]</sup>,但有关棉花感病中 PR 蛋白的报道并不多见,Liu<sup>[10]</sup>首次报道了棉花在黄萎病菌侵染后有 PR 蛋白的出现,其分子量在 17~ 24 kD 和 28~ 33 kD 之间,其中一种有儿丁酶活性。本试验以棉花黄萎病菌毒素处理不同抗性棉花品种的愈伤组织,对 POD, SOD 活性及 PR 蛋白随病程发展的动态变化进行研究,以探索酶活性和病原相关蛋白在不同时期与品种抗黄萎病之间的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 黄萎病菌的培养及毒素制备

大丽轮枝菌株(*Verticillium dahliae*)由中国农科院植保所棉病组提供,培养方法参见文献<sup>[11]</sup>,将在固体培养基上保存的菌株移入装有 100 mL Czapek's 液体培养基的三角瓶中,25 ℃ 振荡培养 14 d,将菌液经 3 000 g 离心 20 min,上清液经 0.45 μm 的微孔滤膜抽滤,滤液为大丽轮枝菌粗毒素。参照 Bradford 法<sup>[12]</sup>,以 BSA 为标准蛋白,测定粗毒素中蛋白质浓度为毒素浓度。

### 1.2 供试棉花品种及愈伤组织培养

实验材料有抗黄萎病品种 BD 18、感病品种泗棉 3 号、耐病品种中棉 12 号共 3 个棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种,均由中国农科院植保所棉病组提供。

棉花种子经 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消毒 2 h,无菌水冲洗 3~ 4 次,置于 250 mL 含有无菌水的三角瓶中无菌吸涨 24 h,种子露白后,在超净工作台上,将种皮剥落,裸种置于不含任何激素的 1/2 MS 无机盐,自来水质, pH 7.0 的培养基中,25 ℃ 下,每天光照 12 h 培养,4 d 后,无菌苗长至 6~ 7 cm 时进行愈伤组织诱导。

切取无菌苗下胚轴长为 0.5~ 0.8 cm 的切段,将其转移于含诱导培养基的培养皿中,诱导培养基为 1/2 MS 基本培养基附加 IAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>, 2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, KT 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,培养条件同前,培养 3 d 后有愈伤组织产生。

### 1.3 毒素处理

将在诱导培养基上培养了 20 d 的愈伤组织转移至含毒素的诱导培养基中,毒素浓度为 15 μg·mL<sup>-1</sup>,以在不含毒素的培养基上愈伤组织为对照,分别在毒素处理后的 0, 1, 2, 5, 8, 12, 16, 20 d 取材,准确称取愈伤组织 0.5 g,液氮速冻处理,- 20 ℃ 保存。

### 1.4 POD 酶活性的测定

POD 活性的测定用愈创木酚法<sup>[13]</sup>。取液氮处理的愈伤组织 0.5 g,加入适量 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH 5.5,含 1% PVP)匀浆提取,4 ℃ 下,1 × 10<sup>4</sup> g 离心 15 min,上清液为酶粗提液。酶活测定的反应体系含 2.9 mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液,1 mL 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1 mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 愈创木酚和 0.02 mL 的酶液,测定 470 nm 处的 OD 值,以 ΔOD·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> 为酶活单位。

### 1.5 SOD 酶活性的测定

SOD 活性的测定用 NBT 法<sup>[14]</sup>。取 0.5 g 液氮处理的愈伤组织,加入适量 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH 7.8,含 1% PVP)匀浆提取,4 ℃ 下,1 × 10<sup>4</sup> g 离心 30 min,上清液为酶粗提液,冰浴待用。每次测定前先打开光源预热 0.5 h,光照度稳定在 4 000 lx。酶活测定的反应体系总体积 3 mL,内含 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液, pH 7.8,甲硫氨酸 13.37 mmol·L<sup>-1</sup>, EDTA 100

$\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , NBT  $77.12\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , VB<sub>2</sub>  $80.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 加入不同体积的酶液。以相同的反应管不照光为对照, 不加酶液的反应管为最大光化还原管。照光反应后立即避光, 迅速测定 A<sub>500</sub> 值, 求得不同体积粗酶液的抑制百分率和 50% 抑制率的酶液体积。以抑制 NBT 光化还原 50% 的酶量为一个酶活性单位 (U), 酶活单位为  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

## 1.6 蛋白质含量测定

参照 Bradford 法<sup>[12]</sup>, 以 BSA 为标准蛋白。

## 1.7 蛋白质电泳分析

取 0.5 g 在 -20℃ 保存的愈伤组织, 加等量蛋白质提取缓冲液 (Tris-HCl  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.5, 2% PVP, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , CaCl<sub>2</sub>  $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ATP-Na<sub>2</sub>  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , DTT  $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PMSF  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 冰浴条件下充分研磨, 转入离心管中,  $1.2\times 10^4\ \text{g}$  离心 10 min, 取上清液 -20℃ 保存。

蛋白提取液加等量样品处理液 (Tris-HCl  $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6.8, 20% 甘油, 4% SDS, 0.005% 溴酚兰, 10% 巯基乙醇), 煮沸 3 min 后以等量蛋白含量上样, 采用不连续系统 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色。电泳凝胶透射扫描系统 (Personal Densitometer SD) 进行扫描分析。

## 2 结果

### 2.1 棉花愈伤组织对黄萎病菌毒素的感病程度

在黄萎病菌毒素诱导下, 3 个棉花品种愈伤组织所表现出的症状程度有所不同 (图 1)。泗棉 3 号愈伤组织出现萎蔫、褐化的症状最早, 程度最严重, 即诱导 2 d 就出现褐化现象, 5~8 d, 褐化程度严重并有所萎蔫; 中棉 12 愈伤组织出现症状稍晚, 在 3~4 d 后开始有褐化; BD 18 也在 3~4 d 后开始褐化, 但症状较中棉 12 轻。8~12 d 后愈伤组织的症状逐渐有所缓解, 在已褐化的愈伤组织块的局部又有白色愈伤组织长出, BD 18 新愈伤组织出现的多。可见, 不同品种的棉花对黄萎病菌毒素的敏感性不同, 表现出不同的抗性。

### 2.2 棉花愈伤组织中 POD 活性的变化

不同抗性棉花品种在黄萎病菌毒素诱导后 POD 活性变化趋势如图 2-a 所示, 感病品种泗棉 3 号在诱导开始 1 d 后, POD 活性由原初的  $2.93\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  升至  $3.23\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , BD 18 的 POD 活性反而在 1 d 时有下降, 由原初的  $2.35$  降为  $1.3\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , 中棉 12 POD 活性升高最大, 由  $2.95$  迅速升为  $4.69\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。1~5 d 3 个品种的 POD 活性均上升, 5 d 时出现一峰值, 分别达到  $7.50$ ,  $6.21$  和  $7.27\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , 但随后又迅速下降, 8 d 时降为最低值, 泗棉 3 号降为  $1.77\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , 中棉 12 为  $2.77\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , BD 18 的 POD 活性仅为  $0.89\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在诱导后期, 12~20 d 之间, POD 活性的变化又呈上升趋势, 泗棉 3 号升高至  $18.43\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , 中棉 12 升至  $16.13\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , BD 18 升至  $13.82\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。可见, 诱导后期与前期相同, 也是感病品种 POD 活性升高迅速, 抗病品种 POD 活性的升高较之为缓。

### 2.3 棉花愈伤组织中 SOD 活性的变化

从试验结果可以看出 (图 2-b), 在黄萎病菌毒素诱导下棉花愈伤组织中 SOD 活性的变化主要发生在诱导前期, 感病品种泗棉 3 号愈伤组织在诱导前期 SOD 活性急剧下降, 由原初的

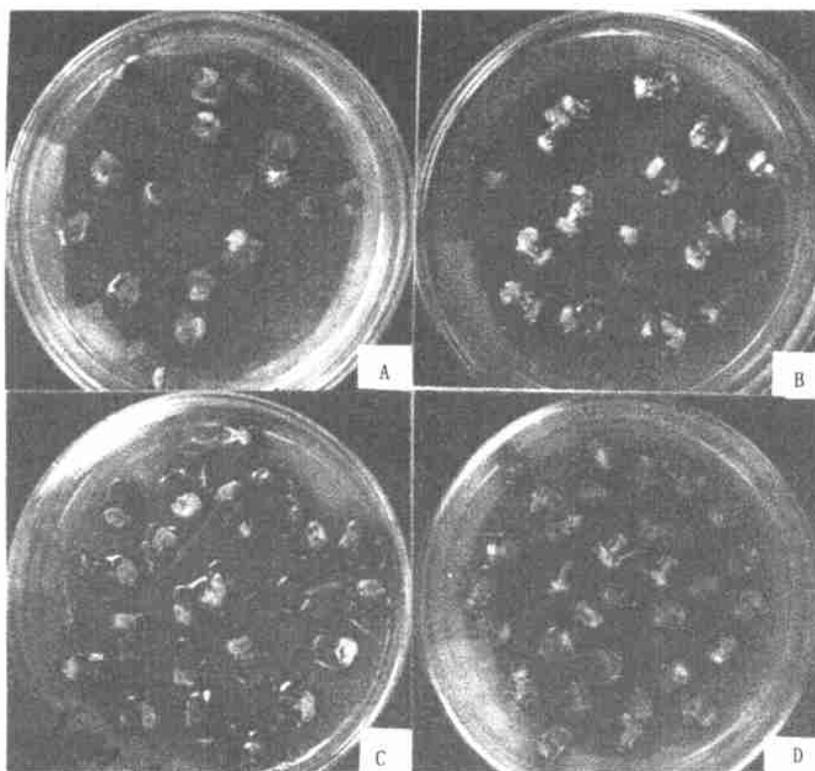


图1 棉花愈伤组织在黄萎病菌毒素诱导下的感病程度

A: 中棉 12(CK), 未经毒素诱导; B: 中棉 12(CK), 毒素诱导 5 d;  
C: 泗棉 3 号, 毒素诱导 5 d; D: BD18, 毒素诱导 5 d

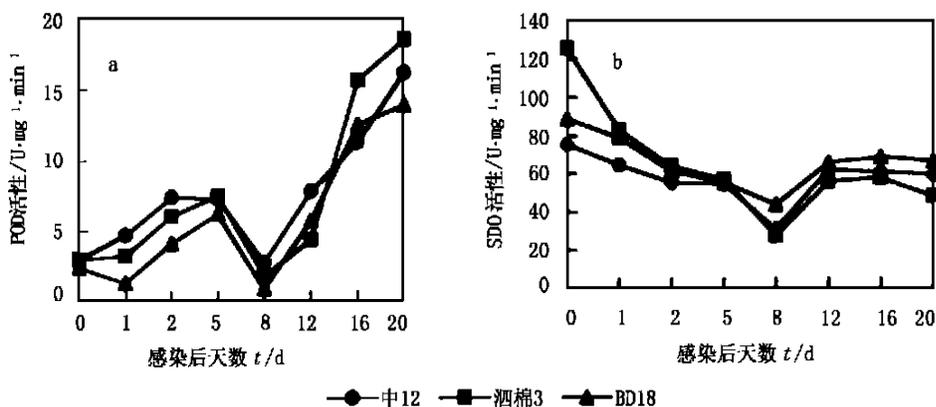


图2 黄萎病菌毒素诱导棉花愈伤组织 POD 活性和 SOD 活性的变化

125.4 降为 8 d 时的 27.25  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 仅为原初活性的 20%; 中棉 12 SOD 活性由 75.68 降为 30.80  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 为原初活性的 40%; 而抗病品种 BD 18 SOD 活性的降低较小, 8 d 时的 SOD 活性为原初的 50%, 由 88.94 降为 43.61。在诱导后期, 12~20 d SOD 活性又有升高, BD 18、中棉 12 分别上升为 65.65 和 61.97  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 并保持这一水平至 20 d; 泗棉

3 号升为  $55.42 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 但 20 d 时又降为  $47.71 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

## 2.4 棉花愈伤组织在黄萎病菌毒素诱导过程中的病原相关蛋白

从图 3 SDS-PAGE 结果可看出, 在黄萎病菌毒素诱导下棉花愈伤组织中的可溶性蛋白质随诱导时间而发生变化, 3 个棉花品种愈伤组织中均在诱导后的 2 d 有多条新蛋白条带出现, 主要是低分子量蛋白如 16~25、31~33 kD 的蛋白条带, 5~8 d 时其表达量达到最高水平。电泳凝胶扫描结果表明, 中棉 12 在诱导后与对照相比增加了 5 条蛋白带, 分别为 16, 20, 22, 33 和 42 kD; 此外, 18, 25 和 31 kD 的蛋白条带含量明显增加; 其他 2 个品种中也检测到类似的结果, BD 18 在诱导后出现 16, 20, 22, 33 kD 的蛋白条带; 泗棉 3 号没有检测到 20 kD 的条带, 22 kD 条带也很弱, 但其 16, 18, 33 kD 的蛋白带含量增加较明显。诱导 12 d 后, 3 个棉花品种愈伤组织中蛋白含量都开始减少。在病菌毒素诱导的同时加入外源水杨酸, 愈伤组织表现出的病症明显减弱, 同时这些蛋白带的表达量也有改变(数据另有报道)。结果表明, 这些在毒素诱导下新增加的蛋白条带与抗黄萎病症的产生和发展有关, 既为病原相关蛋白。从结果推测, 这些新增加的蛋白质可能与棉花抗黄萎病关系密切。

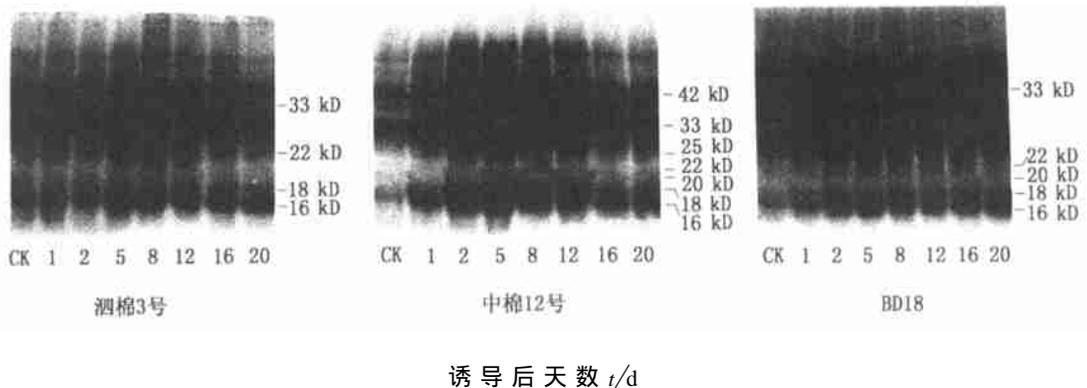


图 3 棉花愈伤组织感染黄萎病菌毒素后总蛋白的 SDS-PAGE

## 3 讨论

从结果可以看出, 在黄萎病菌毒素诱导下棉花愈伤组织中酶活性的变化呈现 2 个阶段, 在诱导的前期即 1~8 d, 体内物质的变化与抗病菌毒素关系密切, 对诱导棉花愈伤组织的抗黄萎病起更重要的作用。

在棉花黄萎病菌毒素的诱导下, 不论抗病、感病品种, POD 活性都随感病后症状的发展而增加, 但感病品种 POD 活性增加快于抗病品种, 这一结果与以前有关棉花抗病性的研究结果相一致<sup>[3]</sup>, 而与多数植物的抗病性与 POD 活性成正相关的关系相反, 其原因可能主要是棉花材料本身的性质所决定。棉花体内普遍存在有酚类物质, 而酚类物质的氧化与 POD 有关, POD 活性的增强可大大增加酚氧化物的含量<sup>[15]</sup>。并且有报道在棉花抗病品种中酚类物质的含量高于感病品种<sup>[16]</sup>, 因此, 本研究结果中在黄萎病菌毒素的诱导下抗病品种 POD 活性的升高小于感病品种, 可能就与抗病品种体内酚类物质水平较高有关。其次, 由于本试验所使用的是愈伤组织细胞, 其缺少细胞壁的次生长, 因此在愈伤组织细胞中由于 POD 活性的增加而增强木质素的聚合过程, 对提高棉花的抗黄萎病可能不起主导作用。Lagrimini<sup>[17]</sup>也曾报道, 在烟

草愈伤组织中富含碱性 POD 同工酶,而未检测到酸性 POD 同工酶,催化木质素形成的酶主要是酸性 POD 同工酶。

SOD 具有清除自由基,保护蛋白质、细胞膜免受活性氧毒害的作用。在棉花黄萎病菌毒素的诱导下,棉花愈伤组织中 SOD 活性有明显变化,表明诱导过程引起棉花愈伤组织防御系统的保护酶发生改变,特别是在诱导前期。感病品种 SOD 活性随诱导而迅速下降,耐、抗病品种 SOD 活性的降低较慢。由于 SOD 活性的下降,组织中超氧离子浓度和活性相应增高,高浓度超氧离子的存在,引起细胞膜脂过氧化,膜结构和功能受到破坏,因此感病品种细胞病症出现的早且较严重。

病原相关蛋白(PR 蛋白)在健康植物中不存在或表现微弱,而当植物被病菌侵染或诱导后,则迅速产生并积累,并在植物的抗病性中起作用<sup>[18]</sup>。在黄萎病菌毒素的诱导下,棉花愈伤组织体内明显积累分子量在 16~ 25, 31~ 33, 42 kD 的 PR 蛋白,且抗、耐性品种比感病品种蛋白条带多、含量大。这一结果与 Liu 所报道的在棉花幼苗中病原菌诱导的 PR 蛋白的范围相吻合。因此认为这些新增加的蛋白条带可能就是 PR 蛋白,它们在棉花抗黄萎病中起重要的作用。对烟草、玉米和番茄中的 PR 蛋白研究较多<sup>[19~ 21]</sup>, PR 家族中有 4 个是属于几丁质酶(PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), 1 个葡聚糖酶(PR-2), 1 个蛋白酶抑制剂(PR-6)和 1 个特异的过氧化物酶(PR-9)。在本试验结果中,由于黄萎病菌毒素诱导的 PR 蛋白表达的最高峰并不伴随有 POD 活性和 SOD 酶活性的提高,相反却出现有酶活性的低谷,由此推测,这些 PR 蛋白可能并不具备 POD、SOD 的特性。那么,这些 PR 蛋白的特性如何以及它们是否具有几丁质酶和葡聚糖酶的活性? 有关的研究我们正在进行中。

## 参 考 文 献

- 1 刘学堂,宋晓轩,郭金城 棉花黄萎病菌的研究及最新进展 棉花学报, 1998, 10(1): 6~ 13
- 2 沈其益主编 棉花病害基础研究与防治 北京: 科学出版社, 1992
- 3 田秀明,杜利峰 棉花对枯萎病的抗性与过氧化物酶活性的关系 植物病理学报, 1991, 21(2): 94~ 98
- 4 Espelie K E, Franceschi V R, Kolattukudy P E Immunochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue Plant Physiol, 1986, 81: 487~ 492
- 5 夏正俊,顾本康,吴蔼民,等 棉花品种抗黄萎病性与体内生化成分相关分析 植物保护学报, 1994, 21(4): 305~ 310
- 6 Polle A, Otter T, Seifert F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway Spruce Plant Physiol, 1994, 106: 53~ 60
- 7 Smit F, Dubery IA. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor Phytochemistry, 1997, 44: 811~ 815
- 8 吴蔼民,夏正俊,顾本康 棉花不同生育期同工酶与品种抗黄萎病性相关性的研究 棉花学报, 1998, 10(2): 96~ 100
- 9 White R F, Antoniv J F. Virus-induced resistance responses in plants Plant Science, 1991, 9: 443~ 455
- 10 Liu R J, Li H F, Shen C Y, et al Detection of pathogenesis-related proteins in cotton plants Physiol and Molecular Plant Pathology, 1995, 47: 357~ 363
- 11 章元寿,王建新,刘经芬,等 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定 真菌学报, 1989, 8(2): 140~ 147
- 12 Bradford M N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

- using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~ 254
- 13 Rama Rao N, Naithani S C, Josdanwala R T, et al. Changes in indoleacetic acid oxidase and peroxidase activities during cotton fibre development. *Z Pflanzen Physiol Bd*, 1986, 106S: 157~ 165
  - 14 沈文飏, 徐朗莱, 叶茂炳, 张荣铤. 氮蓝四唑光化还原法测定超氧化物歧化酶活性的适宜条件. *南京农业大学学报*, 1996, 19(2): 101~ 102
  - 15 铃木直治等著译. *近代植物病理化学*. 上海: 上海科技出版社, 1985
  - 16 吴小月, 范连益. 陆地棉品种抗枯萎病有关生理生化性状的研究. *江苏农业学报*, 1993, 9(2): 28~ 35
  - 17 Lagrimini L M, Rothstein S. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*, 1987, 84: 438~ 442
  - 18 Van Loon L C. Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. *European J of Plant Pathology*, 1997, 103: 753~ 765
  - 19 Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, et al. Biological function of 'pathogenesis related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ glucanase activity. *The EMBO J* 1987, 6(11): 3209~ 3212
  - 20 Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, et al. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of National Academy of Sciences, U S A*, 1987, 84: 6750~ 6754
  - 21 Nasser W, Tapia M de, Kauffmann S, et al. Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases. *Plant Molecular Biology*, 1988, 11: 529~ 538