河南农业科学,2012,41(7):84-87
Journal of Henan Agricultural Sciences

黄萎菌诱导棉花活性氧及保护酶系的变化研究

丁锦平[1],张庆琛[1],魏　理[1],裴冬丽[1],李成伟[1,2]*
(1.商丘师范学院 生命科学系,植物与微生物互作重点实验室,河南 商丘 476000;
2.周口师范学院 生命科学系,植物遗传与分子育种重点实验室,河南 周口 466001)

摘要:以棉花耐黄萎病品种中棉41和感黄萎病品种冀棉11为材料,通过测定黄萎菌诱导前后活性氧积累及保护酶系活性的变化,研究其与棉花抗性的关系。结果表明:在接种黄萎菌后36 h,2个品种的棉花叶片 O_2^- 产生速率均达到高峰,而中棉41 O_2^- 产生速率明显高于冀棉11;同时,叶片内丙二醛(MDA)的含量也均达到一个高峰,中棉41中MDA含量高于冀棉11;在接种后24 h和36 h,冀棉11和中棉41棉花叶片中超氧化物歧化酶(SOD)活性分别达到一个高峰,且冀棉11变化幅度大于中棉41;对于过氧化物酶(POD)的活性,在接种后24 h,2个品种均达到一个高峰,但是耐病品种中POD活性增加幅度不及感病品种。在棉花与黄萎病菌互作的过程中,活性氧和保护酶系参与不同的抗性反应途径。

关键词:棉花;黄萎菌;活性氧;保护酶;超氧化物歧化酶;过氧化物酶;丙二醛
中图分类号:S435.621　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2012)07-0084-04

Changes of Reactive Oxygen and Protective Enzymes Activities in Cotton Challenged by *Verticillium dahliae*

DING Jin-ping[1],ZHANG Qing-chen[1],WEI Li[1],PEI Dong-li[1],LI Cheng-wei[1,2]*
(1. Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions,Department of Life Science of Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000,China; 2. Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding,Department of Life Science of Zhoukou Normal University,Zhoukou 466001,China)

Abstract: Changes of reactive oxygen and protective enzyme system in different cotton varieties, Zhongmian 41 (tolerant variety) and Jimian 11(susceptible variety),induced by *V. dahliae* were studied. It was shown that malondialdehyde (MDA) content of cotton leaves reached a peak after 36 h induced by *V. dahliae*,which in Zhongmian 41 was higher than in Jimian 11;meanwhile,the cotton leaf O_2^- production rate of two varieties reached a peak,which in Zhongmian 41 was obviously higher than Jimina 11. At 24 h after inoculation,the cotton leaf superoxide dismutase (SOD) activity of Jimian 11 reached a peak,and its variance amplitude was bigger than that of Zhongmian 41,for which the SOD activity reached a peak after 36 h. At 24 h after inoculation, the peroxidase (POD) activity of both varieties reached a peak,but the increase amplitude in the disease-tolerant variety was less than in the susceptible variety. During the interaction of cotton with *V. dahliae*, reactive oxygen and protective enzyme system were involved in different resis-tance-response pathway.

Key words: cotton; *Verticillium dahliae*; reactive oxygen; protective enzymes; superoxide dismutase (SOD); peroxidase(POD); malondialdehyde(MDA)

收稿日期:2011-12-02
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项子课题(2008ZX08010-004);河南省科技厅基础与前沿项目(122300410226);河南省教育厅自然科学项目(2011A180024)
作者简介:丁锦平(1976-),女,河南长垣人,讲师,博士,主要从事棉花种质创新及分子生物学研究。E-mail:jinpingding@163.com
*通讯作者:李成伟(1972-),男,河南民权人,教授,博士,主要从事植物与病菌互作研究。E-mail:lichengweiwau@ hotmail.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

高等植物在生长发育过程中经常要遇到逆境胁迫,其中病原微生物(真菌、细菌和病毒)是高等植物正常生存与发展的主要威胁之一。植物在被不同病原物侵袭的过程中,逐渐形成了复杂的防御机制来保护自己。受病原菌侵染的植物体内所产生的保护酶系,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化物酶(peroxidase,POD)等,及活性氧累积与植物抗病性密切相关[1-2]。丙二醛(malondialdehyde,MDA)是植物器官衰老或在逆境条件下受伤害时,其组织或器官膜脂质发生过氧化反应而产生的,它的含量与植物衰老及逆境伤害有密切关系[3]。

棉花黄萎病是棉花生产上的主要病害之一[4-5],研究黄萎菌引起棉花不同抗性品种体内的物质变化,是揭示棉花抗性机制的基础。为此,以棉花黄萎菌处理不同棉花品种,对活性氧的积累、SOD、POD活性、MDA 含量随病程发展的动态变化进行研究,以探索活性氧及保护酶系生理指标在不同时期与品种抗黄萎病之间的关系,解析棉花抗病机制,以期为棉花抗性育种提供参考。

1　材料和方法

1.1　黄萎菌和棉花品种

供试棉花黄萎菌菌株为中国农业科学院棉花研究所从安阳地区分离的致病力较强的菌株 AY1,供试棉花品种为耐病品种中棉 41 和感病品种冀棉 11。在棉花幼苗 3 片真叶时灌根注射黄萎菌,分别在黄萎菌侵染 0、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h 取样,测定各指标的变化,以注射清水为对照。

1.2　保护酶液的提取

称取叶片 1.0 g,加入少许石英砂和 PVP 至预冷的研钵中,加 5 mL 预冷的磷酸缓冲液(50 mmol/L,pH 值 7.8)于冰上匀浆,装入 50 mL 离心管中,用缓冲液冲洗研钵 2～3 次,取匀浆液于 4 ℃下 10 000 r/min离心 10 min,上清液定容至 20 mL 即为酶提取液[6]。

1.3　不同保护酶活性的测定

1.3.1　SOD 活性测定　参照沈文飚等[7]的方法进行。试验设置 2 个对照:对照酶液在 37 ℃煮 10 min 使 SOD 酶失活,一个对照置于同测定样液的光照条件下,另一个置于暗处用来调零,测 A_{560}。1 个酶活性单位(U)等于每单位时间内抑制光化还原 50%的氮蓝四唑,换算成 U/mg。试验重复 3 次。

1.3.2　POD 活性测定　POD 活性的测定采用愈创木酚法,具体参照 Hammerschmidt 等[8]的方法进行,以 3 min 内平均每分钟 A_{470} 变化值表示酶活性大小,换算成 U/(g·min)。试验重复 3 次。

1.4　O_2^- 产生速率的测定

采用羟胺氧化法,具体参照王爱国等[9]、王晨芳等[6]加以改进的方法进行,测 A_{530},用 NO_2^- 做标准曲线。试验重复 3 次。

1.5　MDA 含量的测定

参照王晨芳等[6]的方法,稍加改进。称取叶片 0.5 g,加入 2 mL 预冷的 5%三氯乙酸,冰浴匀浆提取,再次加入溶液冲洗 2～3 次,将匀浆液于 4 ℃下 10 000 r/min 离心 10 min,取上清定容至 20 mL。吸取上清液 2 mL,加入 2 mL 0.5%硫代巴比妥酸溶液,沸水浴 10 min,冷却后 6 000 r/min 离心 15 min,分别测上清液 A_{532}、A_{450}和 A_{600}值。MDA 计算公式:$MDA(\mu mol/g)=[6.452\times(A_{532}-A_{600})-0.559\times A_{450}]\times V_T/(W\times V_1)$,其中 V_T 为提取液总体积,V_1 为测定用提取液体积,W 为样品鲜质量。试验重复 3 次。

2　结果与分析

2.1　黄萎菌诱导棉花叶片 O_2^- 产生速率的变化

由图 1 可见,接种黄萎菌后 36 h,中棉 41 和冀棉 11 两个品种的棉花叶片 O_2^- 产生速率均达到一个高峰,而中棉 41 O_2^- 产生速率明显高于感病品种冀棉 11,未接菌的 2 个品种 O_2^- 产生速率接近。之后,接种黄萎菌的 2 个棉花品种叶片 O_2^- 产生速率逐渐下降,直至与对照接近。

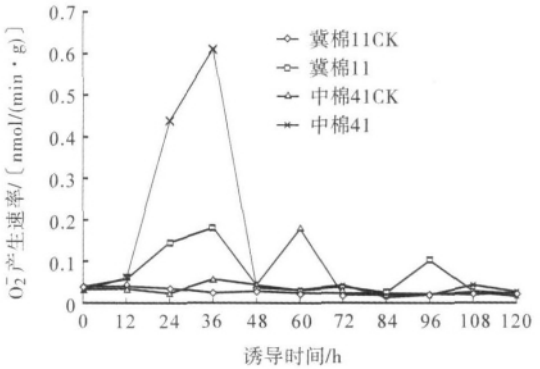

图 1　黄萎菌诱导棉花叶片 O_2^- 产生速率的变化

2.2　棉花与黄萎菌不同组合中保护酶系的变化

2.2.1　SOD 活性的变化　由图 2 可知,感病品种冀棉 11 接菌后 24 h,棉花叶片 SOD 活性达到一个高峰,明显高于对照,并且高峰比耐病品种中棉 41 出现的时间早;之后 SOD 活性有所下降,但与对照相比略高。而耐病品种中棉 41,SOD 活性在接菌后

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

36 h 达到高峰，并且明显高于对照，48 h 之后活性虽然逐渐上升，但与对照无明显区别。

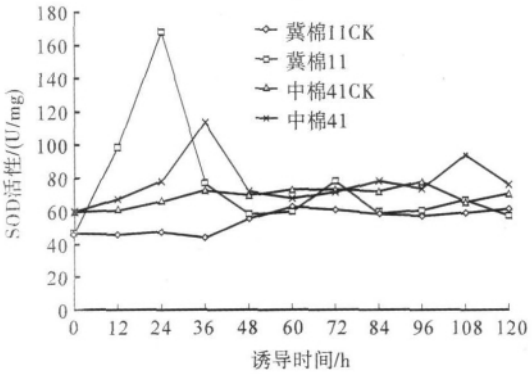

图 2 黄萎菌诱导棉花叶片 SOD 活性的变化

2.2.2 POD 活性的变化 从图 3 可看出，接种黄萎菌后，2 个棉花品种的 POD 活性均迅速上升并高于对照，冀棉 11 和中棉 41 分别接种 24 h 和 36 h 后活性下降至与对照相似，但是耐病品种中 POD 活性增加幅度不及感病品种。

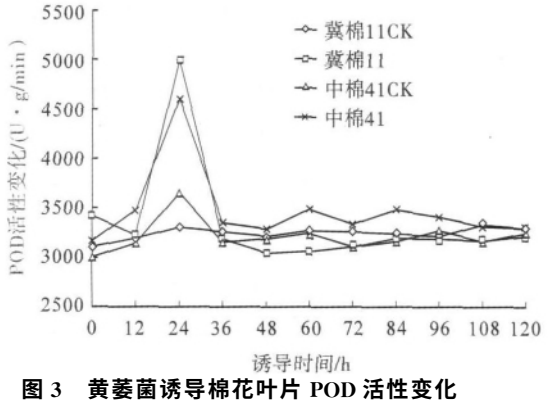

图 3 黄萎菌诱导棉花叶片 POD 活性变化

2.3 MDA 含量的变化

MDA 是最常用的膜脂过氧化指标，对细胞膜有毒害作用。图 4 表明，接种黄萎菌后，2 个棉花品种均在接种后 24～36 h，丙二醛的含量迅速上升并高于对照，之后含量下降至与对照相似，但是耐病品种中 MDA 含量都高于感病品种。耐病品种在接菌 48 h 后，MDA 的含量有上升趋势。感病品种在接菌后 36 h，丙二醛的含量有一个高峰值，但增长幅度明显低于耐病品种，其他时间与对照接近。

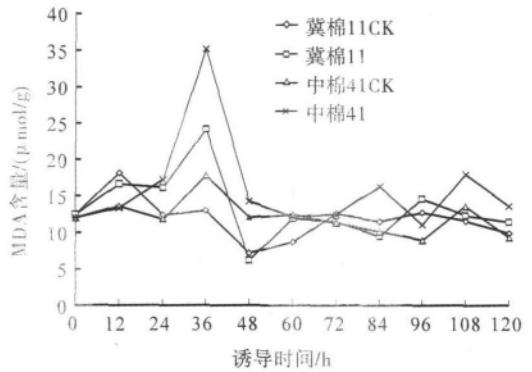

图 4 黄萎菌诱导棉花叶片 MDA 含量的变化

3 讨论

许多研究证明，植物体内活性氧的产生和积累与病原物诱导有密切的关系[10]。而植物体内各种保护酶系的代谢与活性氧的变化有着密切关系，植物对病原物的抗性不同，酶系的代谢表现出很大的差异[11-14]。本研究发现，棉花与黄萎菌互作体系中，耐病品种的 O_2^- 产生速率整体上明显高于感病品种，接菌后 36 h，中棉 41 和冀棉 11 两个品种的棉花叶片 O_2^- 产生速率均达到一个高峰，可能因为该时间点正好是病原菌与寄主植物的细胞壁接触，使得病原物释放的激发子与寄主受体相互识别，进而使耐病品种产生自身防御反应[6]。

有研究报道，SOD 活性与棉花品种抗黄萎病之间有相关性[15-16]。本研究结果显示，在受黄萎菌诱导后，中棉 41 的 SOD 活性在接种后 36 h 有一个小高峰，而感病品种在接种后 24 h SOD 活性达到高峰，并且明显高于耐病品种。这与 Chen 等[13-14,17]研究的结果相似。说明耐病品种清除活性氧的能力不及感病品种，从而表现为 O_2^- 含量较多，寄主耐病。

病原菌侵染植物时，引起植物体内活性氧的大量积累，植物体内膜系统中的不饱和脂肪酸受到活性氧（主要是 O_2^-）的直接攻击，导致膜脂过氧化作用的发生[6]。MDA 的含量可以衡量脂类过氧化作用的强弱程度。试验中发现，棉花 2 个品种均在接菌 24 h 后，MDA 含量明显升高，耐病品种升高幅度高于感病品种。Ge 等[18-19]在水稻与稻瘟病菌互作研究中得到相似结果，即互作过程中 MDA 含量与品种抗性呈正相关。

对 POD 研究结果显示，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[20]。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[21]。因此，本研究结果与前人报道一致，在黄萎病菌毒素的诱导下抗病品种 POD 活性的变化幅度小于感病品种，可能与抗病品种体内酚类物质水平较高有关。POD 保护酶在棉花抗病机制中不同于 SOD 酶的保护机制。

综上所述，棉花受黄萎菌侵染时，活性氧及保护酶系活性、MDA 含量都有一定程度的变化，并且变化在抗（耐）/感病品种间表现出一定的差异。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 251-275.

[2] Wojtaszek P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection[J]. Biochem J, 1997, 322: 681-692.

[3] 商闯,马春红,翟彩霞. 丙二醛(MDA)含量在玉米诱导抗病过程中的变化[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 29-32.

[4] 杨秀荣,刘水芳,孙淑琴. 棉花枯、黄萎病的诊断与防治[J]. 天津农业科学, 2010(2): 51-53.

[5] 许爱玲. 山西省棉花黄萎病菌致病力分化研究[J]. 山西农业科学, 2006, 34(1): 58-60.

[6] 王晨芳,黄丽丽,张宏昌. 小麦—条锈菌互作过程中活性氧及保护酶系的变化研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 52-60.

[7] 沈文飚,徐朗莱,叶茂炳,等. 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[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(2): 101-102.

[8] Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kug J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium* [J]. Physiol Plant Pathol, 1982, 20: 73-82.

[9] 王爱国,罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990(6): 55-57.

[10] 郭泽建,李德葆. 活性氧与植物抗病性[J]. 植物学报, 2000, 42(9): 881-891.

[11] Jia X L. Studies on the interactions and mechanisms of incompatibilities between wheat and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 1997.

[12] Jin Z H, Li C S, Yang T T, *et al*. Physiological reactions of tomato after late blight inoculation[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2007, 27(12): 2461-2465.

[13] Chen L F, Song Y L, Xu Y G. Comparison for activities of superoxied dismutase and catalase between scab-resistant and susceptible wheat varieties[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(3): 209-213.

[14] Song H C, Shi X Q. The relationships of changes in antioxidant enzymes of rice seeding infected by *Magnaporthe grisea* to the blast resistance[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2006, 24(4): 378-382.

[15] 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[J]. 棉花学报, 1998, 10(2): 96-100.

[16] 夏正俊,顾本康,吴蔼民. 棉花品种抗黄萎病性与体内生化成分相关分析[J]. 植物保护学报, 1994, 21(4): 305-310.

[17] Li L Z, Zhao H J, Yang H W. The relationship between wheat rust and metabolism of active oxygen in leaves[J]. Plant Physiol Commun, 1999, 35(2): 115-117.

[18] Ge X C, Song F M, Zheng Z. Active oxygen production in rice seedlings infected by *Magnaporthe grisea* involved in the blast resistance[J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 2000, 26(3): 227-231.

[19] Ge X C, Song F M, Zheng Z. Relationship between lipid peroxidation and rice resistance to *Magnaporthe grisea*[J]. Journal of Zhejiang University, 2000, 26(3): 254-258.

[20] 李颖章,韩碧文,简桂良. 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[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(3): 73-79.

[21] 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[J]. 江苏农业学报, 1993, 9(2): 28-35.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net