

诱抗剂对彩色棉花一些抗病相关生化物质的影响

王荣, 李冠*, 李燕

(新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要:以水杨酸(SA)、 FeSO_4 、 K_2HPO_4 、 MgCl_2 、SA- FeSO_4 、SA- MgCl_2 为诱抗剂,测定了新疆彩色棉花不同品种喷施诱抗剂后再接种枯萎菌幼苗叶片的叶绿素含量, PAL、CAT酶活性, PR蛋白的表达及信号物质SA含量的变化。结果表明,诱导后挑战接种,叶绿素含量、PAL、CAT酶活性都有增加,且抗病品种高于感病品种。经SDS-PAGE电泳分析,叶片中有数种病程相关蛋白(PR蛋白)表达,信号物质SA含量呈先上升后下降的变化趋势。

关键词:诱导抗病性; 枯萎病; 彩色棉花

中图分类号: S432.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2005)02-0107-05

Effects of Inducers on Relevant Resistant Substance in Colored Cotton

WANG Rong, LI Guan*, LI Yan

(College of Biology, XinJiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: According to this present situation, the promising way is inducing the plant acquired the SAR by inducer. It has some advantages, e. g. safe, efficient, wide and last etc. Inducing resistance is a kind of hereditary potential of plant. And the potential can be expressed if we use appropriate inducer, which can strengthen the ability of resistance against germs, fungi and viruses.

We studied different varieties of colored cotton in Xinjiang, and screened out several effectivley inducers. Having used SA, FeSO_4 , K_2HPO_4 , MgCl_2 , SA- FeSO_4 , SA- MgCl_2 , we induced two species: Xincaimian1 and Xincaimian3. Then searched the change of different resistance substance in leaves after infection with *Fuserium oxysporum*. The result showed great changes have taken place in the content of relatively resistance substance after inducement and challenge. There are two parts. (1) the content of chlorophyll, and activity of phenylalanine ammonia lyase(PAL) & calatase(CAT) in contrast to control have remarkably increased. And, Xincaimian1, a resistant cultivar, showed a higher increasing rate of them than a susceptible cultivar, Xincaimian3. (2) After inducement, the change of SA, which is possible signal in SAR, can be detected in two varieties of colored cotton. And it showed the changing trend from increasing to decreasing. With the increasing of content of SA, pathogenesis-related-proteins(PR Proteins) were induced, which can promote the resistance of colored cotton.

From above, it is feasible that inducer can increase the resistance against *Fuserium oxysporum*. The effect of mixture inducers was much better than single ones among the six kinds of inducer.

Key words: induced resistance; *Fuserium oxysporum*; colored cotton

天然彩色棉由于其色彩是天然的,在纺织制衣过程中无需化学漂染,对人类和环境无污染,穿着舒适,经济价值高,引起了人们的广泛关注,并

相继研究开发。但由于彩色棉本身缺乏比较好的抗枯萎病品种,限制了其种植面积及产量的提高。且由于通过传统育种方法选育优良抗病品种需要

较长时间,且难度大。因此,利用化学因子诱导彩棉自身的防御免疫反应是提高其抵御病害能力的有效途径。近年来,陆续报道了水杨酸及草酸钾类化学物质对黄瓜、番茄等的诱导抗性^[1-3],而对彩色棉花诱导抗性的研究国内外均未见报道。本实验选用铁盐(FeSO_4)、 K_2HPO_4 、水杨酸(SA)、 MgCl_2 、SA- FeSO_4 、SA- MgCl_2 作为诱导因子,对新疆彩色棉花不同抗病品种诱导处理后的叶绿素含量, PAL、CAT 酶活性, PR 蛋白及信号物质 SA 进行了研究。

1 材料和方法

1.1 供试品种和菌株

1.1.1 植物材料。抗病品种新彩棉 1 号(棕色),感病品种新彩棉 3 号(绿色)

1.1.2 供试菌株。棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)由本实验室保存,病菌在 PDA 培养基上,28℃ 暗培养 1 周后,以无菌水冲刷,配成 1×10^6 个 $\cdot \text{ml}^{-1}$ 个孢子悬液。

1.2 诱抗剂

(1) K_2HPO_4 ($0.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KOH}$ 调节 pH 至 8.8), (2)水杨酸 $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, (3)铁盐 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, (4) MgCl_2 $0.125 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, (5) SA- FeSO_4 (1 : 1), (6) SA- MgCl_2 (1 : 1), (0) 喷蒸馏水为对照(CK)。

1.3 试验方法

1.3.1 诱抗剂诱导处理。试验设 7 个处理,每处理 60 株。在长至 3~4 叶期的棉苗叶片上,分别用含诱导因子的溶液涂抹,以蒸馏水为对照,保湿 3 h, 3 d 后接种棉枯萎病菌。接种后 2 d 取材,将

棉苗第 1 和第 2 叶除去,再将全部叶片采回剪碎混匀,待用。

1.3.2 叶绿素含量测定。参考文献[4]。

1.3.3 过氧化氢酶活性(CAT)测定。参考文献[5],酶活力表示为蛋白中 O_2 含量($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

1.3.4 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定。参考文献[6],以每克鲜重每小时增加 0.01OD₂₉₀ 为一个酶活力单位。参考文献[7]。

1.3.6 水杨酸(SA)含量的测定。参考文献[8]。选取 FeSO_4 为诱导因子,以蒸馏水为对照。分别测定诱导后 0、2、3、4、5 d 棉苗叶片中内源 SA 含量的变化。称取新鲜叶片 0.5 g, 80% 预冷甲醇研磨,超声抽提 30 min, 8000 g 离心 15 min, 收集上清液,过柱纯化样品,通过高效液相色谱测定 SA 的含量。色谱条件:柱 HP-yersil ODS12.5 cm \times 4.0 mm, 5 μm ; 流动相:45% 甲醇+0.025% 磷酸;检测波长:310 nm;流速 0.5 ml \cdot min⁻¹;柱温:20℃。

2 结果与分析

2.1 叶绿素含量测定

叶片中叶绿素的含量与植物光合作用有密切关系。经不同诱导因子处理后,无论感病品种还是抗病品种,叶片的叶绿素含量比对照都有不同程度的提高,其中,新彩棉 1 号提高 3.95%~23.0%,新彩棉 3 号提高 2.63%~18.8%,说明诱导因子对彩棉叶片叶绿素含量有显著影响。6 种诱导因子中,复合因子处理后叶绿素含量增加最明显,其次为 FeSO_4 ,再次是 SA(表 1)。

表 1 诱导处理后叶绿素含量变化

Table1 Change in contents of chlorophyll after inducement

诱导因子	新彩棉 1 号		新彩棉 3 号	
	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	含量增加/%	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	含量增加/%
CK	2.78	—	2.66	—
K_2HPO_4	2.89	3.95	2.73	2.63
SA	3.02	8.63**	2.79	4.89*
FeSO_4	3.08	10.8**	2.81	5.64**
MgCl_2	2.99	7.60**	2.77	4.14*
SA- FeSO_4	3.42	23.0**	3.16	18.8**
SA- MgCl_2	3.34	20.1**	3.07	15.4**

注: **, $P \leq 0.01$ 水平极显著差异; *, $P \leq 0.05$ 水平显著差异。

2.2 过氧化氢酶活性(CAT)测定

CAT是抗病性标志酶之一。对彩棉叶片诱导接种后的CAT活性进行测定,比对照有所增高,且抗病品种高于感病品种。其中,SA-MgCl₂和FeSO₄两种诱抗剂处理后CAT酶活性比对照增高2~2.5倍,SA-FeSO₄次之(图1)。

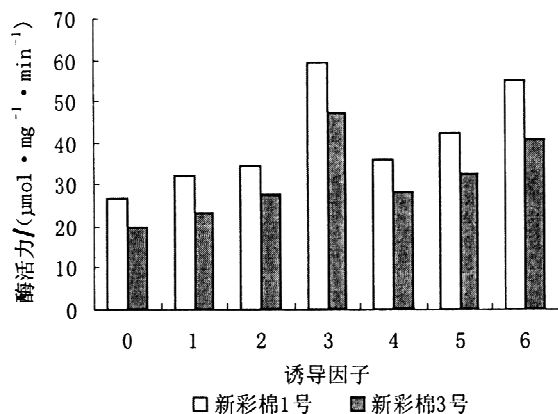


图1 诱导处理对过氧化氢酶活性(CAT)影响
Fig.1 The effect on activity of CAT in colored cotton leaves after inducement

2.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定

PAL是抗病性另一标志酶。从图2可以看出,诱导处理前,耐、感病品种酶活性差别不大,诱导处理后,无论耐感病品种,植株叶片内PAL酶活性均比对照大幅度提高(图2)。

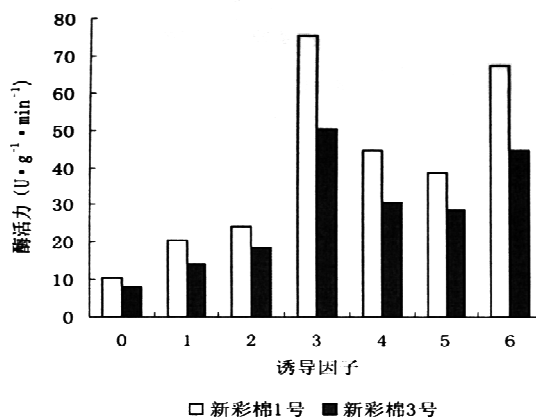
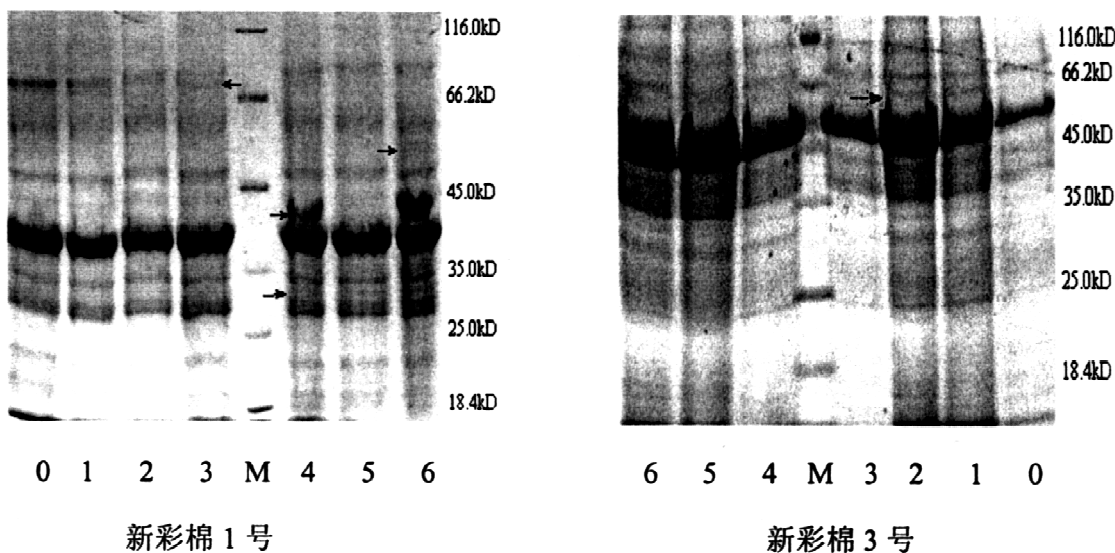


图2 诱导处理对彩棉叶片苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响
Fig.2 The effect on activity of PAL in colored cotton leaves after inducement

2.4 蛋白质电泳分析

对供试品种诱导处理后进行SDS-PAGE电泳检测,经电泳凝胶扫描系统分析,新彩棉1号经诱导后与对照相比,有四条新蛋白条带出现,分别在30kD,Rf=0.679(SA,MgCl₂、SA-FeSO₄、SA-

MgCl₂诱导产生);45kD,Rf=0.468(MgCl₂、SA-MgCl₂诱导产生);60kD,Rf=0.325(SA-MgCl₂诱导产生);78kD,Rf=0.181(FeSO₄诱导产生)处。此外,新彩棉3号也有新蛋白条带出现,如62kD,Rf=0.307(全部诱导因子诱导产生),但数



→为诱导产生的新蛋白条带 M为Mark
图3 诱导处理后彩棉叶片病程相关蛋白(PR proteins)的表达
Fig.3 Induced pathogenesis-related-proteins(PR proteins) after inducement

量明显少于新彩棉1号。这表明,诱导因子处理后,彩棉幼苗代谢水平加强,表现为蛋白质种类的增多和表达水平的增高(图3)。

2.5 SA含量的测定

通过测定诱导后不同时间内源SA含量的变化(图4)。无论耐感病品种,对照均未检出内源SA,经诱导后SA含量明显增高,在48h达到峰值,之后呈下降趋势。而新彩棉3号在随后的96hSA含量略有上升,之后又呈下降趋势。整段时间耐病品种含量高于同时期的感病品种(图4)。

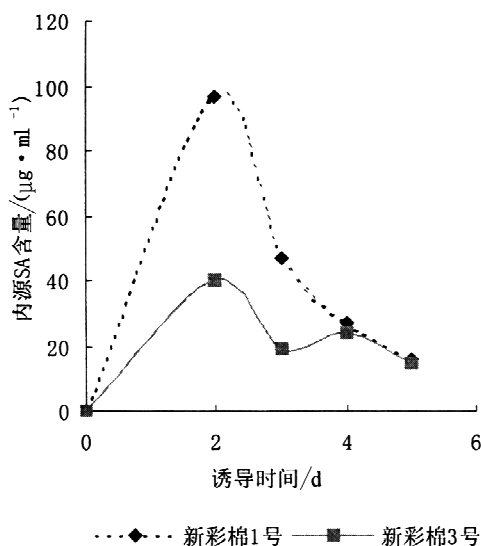


图4 诱导后不同时间彩棉叶片内源SA含量变化

Fig. 4 Change in contents of SA in colored cotton leaves after induction

3 讨论

叶绿素是植物光合作用的基础,而光合作用是衡量植物合成功能的重要生理指标。寄主植物对病原菌的侵染所引起的生理紊乱,主要表现在光合作用受到抑制。经诱导因子诱导处理后,植株叶绿素含量增加,促进其光合作用,从而增强抵御病害的能力。

植物对病原物侵入的生理反应是通过酶的催化而实现的。PAL是植物抗病性物质生成途径—苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,其活性的提高不仅有利于抗病物质—木质素和酚类物质含量的增加,而且有利于SA的合成。CAT是酶类自由基净化剂,能清除自由基和活性氧的积累。经诱导因子处理后,PAL和CAT酶活性都有不

同程度的增加,且耐病品种高于感病品种。因此认为植物次生代谢的速度和强度与品种抗病性强弱有关,而决定次生代谢的关键物质—酶在这一过程中起着重要的作用。

病程相关蛋白(PR)在健康植物中不存在或表现微弱,而当植物被病原菌侵染或诱导后,则迅速产生并积累,在植物的抗病性中起作用。另外,SA作为内源信号分子,能增加病原相关蛋白基因的表达,提高植物抗病性^[9]。经诱导因子诱导处理后,彩棉叶片内源SA含量明显增加,并且在分子量30kD、45kD、60kD、78kD有新的蛋白条带,且耐病品种比感病品种条带多,含量大。这一结果与Liu^[10]所报道的在白棉幼苗中病原菌诱导的PR蛋白的范围基本吻合,但由于品种的差异,彩棉的这些新蛋白条带多集中在高分子量(MW>30kD)的区域。因此认为这些新增加的蛋白条带可能就是PR蛋白,由于这些PR蛋白的表达伴随有PAL、CAT酶活性的提高,由此推测,它可能具有PAL、CAT酶的特性。

综上所述,诱导因子处理后,彩棉体内激活的防卫反应与白棉基本相似,在处理部位迅速提高PAL、CAT活性,从而活化苯丙烷类代谢途径,诱导病程相关蛋白的表达。但是,由于品种的差异,彩棉在抗病机制上也表现出了一些差异,如:PR蛋白的范围及信号物质SA的变化趋势。从诱抗效果看,复合因子诱导处理明显好于单因子,这说明离子间的相互作用对诱导抗病有促进作用。

参考文献:

- [1] 李洪莲,王守正. 黄瓜对炭疽病的诱导抗性的初步研究[J]. 植物病理学报,1993,23(4):327-332.
- [2] 张元恩. 诱导黄瓜系统抗病性的研究[J]. 北京农业大学学报,1989,15(1):65-67.
- [3] 蔡新忠,郑重,宋凤鸣. 水杨酸对水稻幼苗抗性的诱导作用,植物病理学报,1996,26(1):65-67.
- [4] 邹绮. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [5] 宋凤鸣,葛秀春. 枯萎病菌侵染后棉苗内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的变化[J]. 浙江大学学报,

- 1999,25(4):373-377.
- [6] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [7] 李颖章,韩碧文,简桂良. 黄萎病菌毒素诱导棉花愈伤组织中活性和蛋白的变化[J]. 中国农业大学学报,2000,5(3):73-79.
- [8] 李兆亮,原永兵,李冬梅. 薄层层析和高压液相层析技术结合测定植物叶片水杨酸含量[J]. 植物生理学通讯,1997,33(2):130-132.
- [9] 原永兵,曹宗巽. 水杨酸在植物体内的作用[J]. 植物学通报,1994,11(3):1.
- [10] LIU R, J, Li H F, Shen C Y, et al. Detection of pathogenesis-related proteins in cotton plant[J]. *Physiol and Plant Pathology*,1995,47:357-363.
- [11] STROBEL N E, Kuc J A. Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride[J]. *Phytopathology*, 1995, 85(10): 1306-1310. ●