

## 细极链格孢菌蛋白激发子对棉花生长相关酶活性的影响

张志刚,杨晓萍,卢翰,梅正鼎,贺云新

(湖南省棉花科学研究所,湖南常德 415101)

**摘要:**细极链格孢菌蛋白激发子是一种能诱导植物获得系统抗病性的新型蛋白激发子。在湘杂棉 3 号的主要生育期,用细极链格孢菌蛋白激发子(PEAT)蛋白粗提液进行叶面喷施后,对棉花叶片中酶保护系统的变化进行了研究。结果表明,经细极链格孢菌蛋白激发子诱导后,棉花叶片 POD、SOD、NR 的活性与 C/N 比对照显著增加,而 MDA 含量比对照显著减少。这可能是 PEAT 影响棉花细胞内微环境的氧化、还原状态激发植株体内酶保护系统,激活植物自身防卫系统与生长系统,从而使棉花产生对病虫害的抗性,促进了植株生长。

**关键词:**细极链格孢菌;蛋白激发子;保护酶系统

中图分类号:Q814 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2010)02-0120-05

## Effects of Protein Elicitor from *Alternaria tenuissima* on the Enzymatic Protection System in Cotton Leaves

ZHANG Zhi-gang, YANG Xiao-ping, LU Han, MEI Zheng-ding, HE Yun-xin

(Hunan Cotton Research Institute, Changde, Hunan 415101, China)

**Abstract:** The protein elicitor from *Alternaria tenuissima* (PEAT) was previously shown to be an efficient elicitor of induced systematic resistance in several crops. The role of crude extracts of PEAT on enzymatic protection system in cotton leaves by foliar spraying was investigated in growth and development periods of the Hunan Hybrid Cotton 3. Results showed that the activity of POD, SOD, SR and the ratio of C/N increased significantly when PEAT was sprayed on cotton leaves. However, the activity of MDA decreased significantly at the same time. It was speculated that PEAT might affect the redox of microenvironment in cotton leaves. PEAT might elicit the enzymatic protection system and activate the defensive system and growth system. Resistance to disease and pests might be induced and the growth and development might be accelerated in cotton sequentially.

**Key words:** *Alternaria tenuissima*; protein elicitor; enzymatic protection system

激发子(elicitor)是一类对病原菌无直接毒杀作用而可诱导植物产生多重防御反应的化合物。它能模拟病原菌和植物的相互作用,诱导植物产生防卫反应。开展病原菌激发子与植物相互作用的关系及其机理的研究具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。自 E-den 公司利用从 *Ewinia amylovora* 中提取的 Harpin 蛋白激发子成功开发出 Messenger<sup>®</sup>并用于多种病虫害的防治以来,激发子已成为抗病性研究的热点问题。国内外已有多人从多种病原菌中分离纯化出蛋白激发子,如从 *Phytophthora* spp. 和 *Pythium* spp. 中提取的 Elicitin<sup>[4]</sup>,从 *P. boehmeriae* 中提取的 PB90 等<sup>[5]</sup>。Kanoh 等

和 Schaffrath 等分别用稻瘟菌来源的糖蛋白激发子处理水稻叶片,发现可诱导叶片不同抗性反应的发生<sup>[6]</sup>。国内毕咏梅等用从稻瘟病菌细胞壁及培养滤液中获得抽提物处理水稻,发现对水稻苯丙烷类途径酶类和绿原酸具有诱导作用<sup>[7]</sup>。相对而言,从链格孢菌获得的纯化激发子与植物相互作用方面的研究较少。本研究室首次从多种病原真菌中分离出一类新型蛋白激发子,被命名为链格孢菌蛋白激发子 (protein elicitor from *Alternaria tenuissima*, PEAT)。分析表明,其氨基酸和基因的序列完全不同于过敏蛋白和隐地蛋白,是一种全新的蛋白,专利号为 ZL011286660<sup>[8-10]</sup>。本

收稿日期:2009-07-15 作者简介:张志刚(1975-),男,博士,副研究员, zhangzhig@126.com

基金项目:转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08005-001)

文研究了 PEAT 对棉花某些生理、生化指标的影响, 以期为 PEAT 的应用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试验设计

供试棉种湘杂棉 3 号  $F_1$  由湖南省棉花科学研究所提供。试验于 2008 年在中国农业科学院植物保护研究所温室进行。盆栽试验采用直径 60 cm、高 40 cm 的塑料盆, 每盆装草炭土蛭石 1.5 kg(草炭土: 蛭石 = 4: 1)。4 月 25 日播种, 所有肥料于拌土时一次施入, 并混合均匀。根据预备试验, 设计了 5 个 PEAT 处理浓度, 即  $6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  和 0。棉花种子经浓硫酸脱绒、洗净后, 在室温下用 PEAT 蛋白液浸泡处理 6 h, 用清水冲洗 2 遍后播种, 每盆播种 20 粒。出苗后间苗, 每盆留 6 棵苗, 每个处理 9 盆。在苗期(5 月 20 日)、现蕾期(6 月 20 日)、盛花期(8 月 10 日)和吐絮初期(9 月 20 日)前 7 d 根据试验设计进行叶面喷施。

### 1.2 取样与测定方法

**1.2.1 取样方法。** 分别在苗期、现蕾期、盛花期和吐絮初期取主茎上长势基本一致、无病虫害的功能叶(倒 4 叶), 将叶片洗净、吸干, 保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

**1.2.2 测定方法。** 参照李合生等主编的《植物生理生化试验原理和技术》中的方法<sup>[1]</sup>。其中离体法测定 NR, 蒽酮比色法测定可溶性糖, NBT 法测定 SOD, 愈创木酚法测定 POD, 茚三酮溶液显色法测定游离氨基酸总量。丙二醛(MDA)含量测定采

用 TBA 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 对 MDA 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化分解的产物。在一定程度上, MDA 含量的高低可以表示细胞膜脂过氧化的程度和植物对逆境条件反应的强弱。PEAT 诱导后能显著降低 MDA 值(图 1)。苗期以  $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 MDA 含量最低, 比对照分别降低了 20.36%; 蕾期以  $3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 MDA 含量最低, 比对照降低了 39.59%; 花铃期、吐絮期均以  $6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 MDA 值最低, 比对照分别降低了 25.52%、47.08%。这表明 PEAT 处理能显著降低 MDA 值。而 CK 的 MDA 值全生育期明显较高, 说明长期在温室控温  $35^\circ\text{C}$  条件下, 其保护酶系统已无力清除自由基, 细胞膜受到严重伤害, 这可能是 CK 农艺性状比较差的重要原因。

### 2.2 对 SOD 的影响

SOD 是存在于植物细胞中清除自由基的主要酶之一, 其活性高低变化反映植物对氧化损伤的修复能力。从图 2 可知, 不同处理 SOD 活性在不同时期有较大差异。其中, 苗期、蕾期、花铃期均以  $3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 SOD 活性最高, 分别比对照提高了 63.36%、54.87%、21.95%; 吐絮期以  $1.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  最高, 比对照提高 37.06%, 表明 PEAT 诱导后, 能及时清除  $\text{O}_2^-$ , 催化  $\text{O}_2^-$  歧化作用成为分子氧和  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 使活性氧维持在一个动态平衡, 从而防止活性氧伤害。

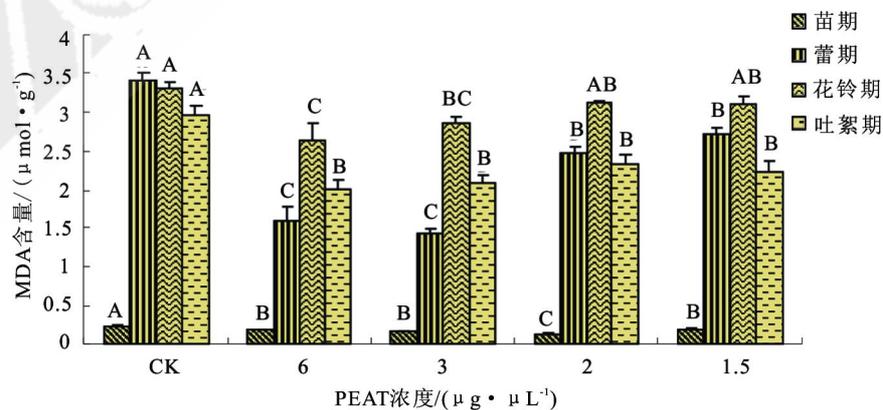


图 1 PEAT 对不同处理 MDA 含量的影响

Fig.1 The effect of various treatments with PEAT on MDA

### 2.3 对 POD 的影响

POD 与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有密切关系,可以反映某一时期植物体内代谢的变化。从图 3 可知,PEAT 诱导后,各个生育

时期 POD 均显著提高,且达到了极显著水平。其中,苗期以  $2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  最高,为对照的 2.07 倍,蕾期、花铃期、吐絮期均以  $3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 POD 值最高,分别为对照的 2.19 倍、1.28 倍和 2.13 倍。

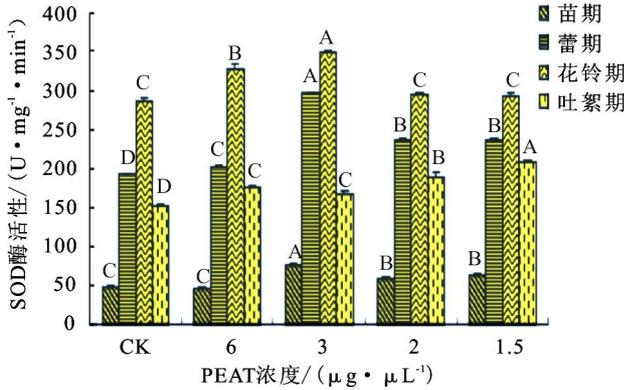


图 2 PEAT 对不同处理 SOD 的影响

Fig.2 The effect of various treatments with PEAT on SOD

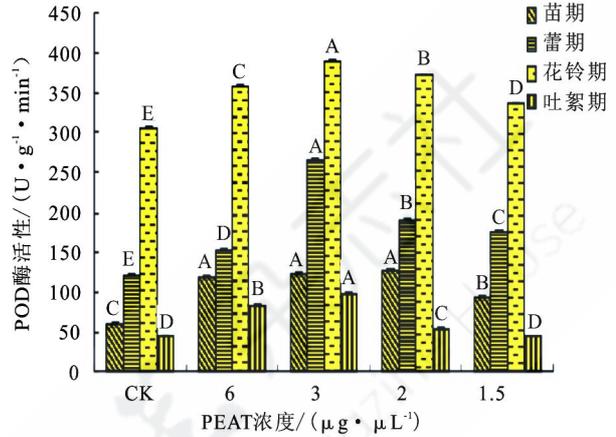


图 3 PEAT 对不同处理 POD 的影响

Fig.3 The effect of various treatments with PEAT on POD

### 2.4 对 NR 的影响

NR 是植物体内硝酸盐同化的关键酶,在体内 N 素代谢中起重要作用,直接影响植物的生长发育和作物的产量及品质。NR 活力变化测定见图 4。从图 4 可知,除吐絮期没有达到显著水平外,其它时期诱导后均达到了显著水平。其中,苗期、花铃期均以  $3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 NR 值最高,分别比对照提高了 68.07%、91.53%,蕾期则以  $6 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 NR 活性最高,达到  $(125.68\pm 1.87) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ,比对照提高了 203.68%。表明 PEAT 诱导后均能促进 NR 活性,催化植物体内的硝酸还原反应,将

硝酸盐还原为亚硝酸盐,提高了植物对氮素的利用率,从而达到促进生长的目的。

### 2.5 对碳氮比(C/N)的影响

可溶性糖与游离氨基酸氮含量以二者比值来表示(C/N)。从图 5 可知,PEAT 诱导后,各个诱导浓度均比对照有不同程度的提高。其中,苗期、花铃期及吐絮期均以  $3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 C/N 值最高,均值分别为 38.07、3.96、0.94,分别比对照提高了 2.80 倍、1.37 倍、1.11 倍;蕾期以  $2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 C/N 值最高,比对照提高了 2.39 倍。

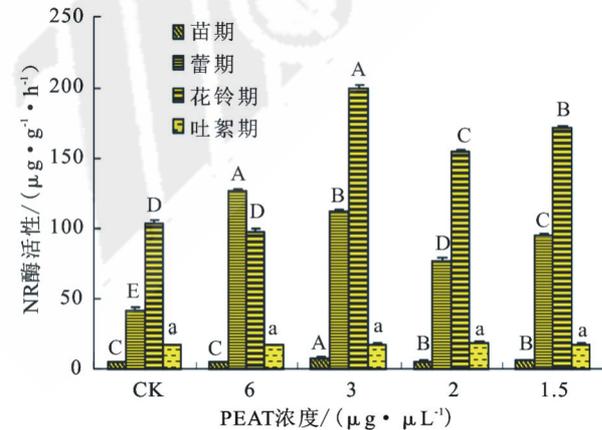


图 4 PEAT 对不同处理 NR 含量的影响

Fig.4 The effect of various treatments with PEAT on NR

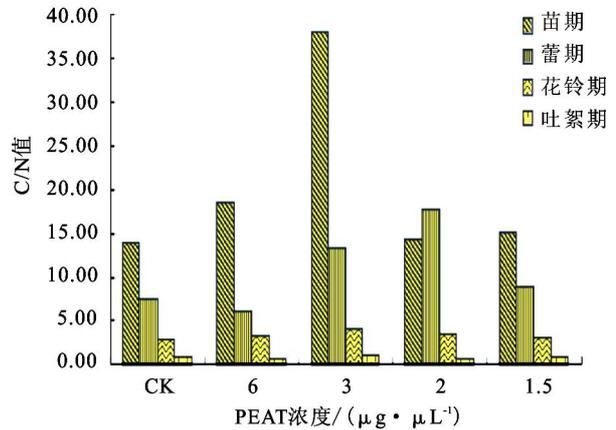


图 5 PEAT 对不同处理碳氮比(C/N)值的影响

Fig.5 The effect of various treatments with PEAT on C/N

### 3 小结与讨论

**3.1 硝酸还原酶是氮素代谢的限速酶,在调节植物对硝酸盐的还原及维持体内多种代谢生理平衡中起重要作用。**NR 是一种诱导酶,其活性水平与其底物浓度呈正相关。许多研究表明,在植物生长发育过程中,根系从土壤中吸收大量氮素的主要形态是  $\text{NO}_3^-$ , 而  $\text{NO}_3^-$  参与代谢作用之前,必须还原成  $\text{NH}_3$ (或  $\text{NH}_4^+$ ), 然后由  $\text{NH}_3$  与碳骨架结合形成各种含氮化合物。植物体内 NR 活性越强,  $\text{NO}_3^-$  的转化速率越高。植物组织中低浓度的  $\text{NO}_3^-$  有利于根系从土壤中吸收更多的  $\text{NO}_3^-$ -N。相反, NR 活性较弱,  $\text{NO}_3^-$  在植物体内大量积累,一方面抑制植物对  $\text{NO}_3^-$ -N 的进一步吸收,另一方面,又会影响氨基酸、蛋白质及其它含氮化合物的合成。同时,植物还原硝酸盐的能力与收获物的蛋白质含量间呈正相关。因此, NR 活性通常被看作是诊断作物营养状况和鉴定作物品质的一项重要指标。PEAT 能够促进棉株生长与改善纤维品质,可能是通过提高 NR 活力来促进对氮的吸收与利用,从而达到促进生长的目的。

**3.2 碳氮比(C/N)是衡量叶片光合产物分配方向的重要指标,也是棉叶碳、氮代谢相对强度和协调程度的反映和体现。**因此,对构成棉株产量和纤维品质的各种化学成分的形成和组合比例有一定影响。本试验结果表明,各个诱导浓度均比对照有不同程度的提高,表明 PEAT 能提高和改善棉株代谢水平,维持体内代谢平衡,促进蛋白质的合成,从而有助于了解棉株碳氮比的变化规律及其与品质形成的内在联系,为采取科学栽培措施、增产增质提供了理论依据。

**3.3 生物体的生长是一系列酶共同作用的结果, SOD、POD 和 MDA 与植物生长关系密切,这三种酶都是植物的重要防御性酶,它们的活性将影响到植物的抗性<sup>[12-15]</sup>。**已有研究表明, SOD 和 POD 对活性氧的清除较为重要。SOD 在细胞防御病毒入侵方面有着十分重要的意义,它可以清除活性氧,以避免其对细胞的伤害。Gupta 等的试验证明,转基因棉花中 SOD 酶活性的超量表达,能够提高植物对外界胁迫的耐受能力<sup>[13-16]</sup>。POD 对植物抗病性有重要作用,被认为是植物抗病的生理

生化指标之一。据报道, POD 在植物细胞壁蛋白的交联反应和木质素的合成中起着非常重要的作用。它利用体内的  $\text{H}_2\text{O}_2$  催化木质素的合成,使植物细胞形成一道“屏障”,阻止病原物的进一步侵染。而丙二醛则是细胞内膜脂过氧化或脱脂的产物,会严重地损伤细胞的生物膜,降低膜中不饱和脂肪酸的含量,使膜的流动性降低。同时,许多学者研究认为,脂膜过氧化还能影响植物的光合作用和呼吸作用,使光合作用和呼吸作用中的电子传递发生一定的改变,从而导致大量流行性氧自由基的产生,进一步引起膜脂过氧化。本试验表明,经 PEAT 诱导后,显著提高了 SOD、POD 的活性,降低了 MDA 含量。这说明,经 PEAT 浸种处理后,由此造成细胞内氧化还原态势的改变和下游信号转导的活化,从而使许多跟氧化还原反应有关的基因表达被加强。随着种子的萌芽和幼苗的生长,逐渐诱导和促进了机体内 SOD 等的合成,从而使体内 SOD、POD 活性升高。这可能说明了 PEAT 促进棉株生长的同时可能诱导了机体内抗氧化酶系统的增强,提高了机体的抗氧化能力,从而增强机体的抗逆性及抗病能力。

**3.4 用 PEAT 诱导后,棉株叶片的酶活性都有明显的变化,这可能是因为 PEAT 影响细胞内微环境的氧化还原状态激发体内保护酶体系。**至于酶活增加,是 PEAT 从基因水平上促进酶的生物合成,增加酶浓度,还是 PEAT 本身刺激酶的活性,尚待进一步研究。同时,这些酶的变化仅限于本实验条件和棉花品种,相关结论能否推及其它棉花品种还需要进一步研究探讨。

#### 参考文献:

- [1] 范 军,彭友良. 水稻悬浮细胞中稻瘟菌激发子诱导性受体类似激酶 cDNA 的克隆及特征分析[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 235-241.  
FAN Jun, Peng You-liang. Cloning and characterization of an elicitor inducible receptor like kinase cDNA from rice suspension cells[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1999, 29(3): 35-241.
- [2] ARASE S, Katsuka M, Itoi S. Some observations on hyphal growth and host responses in leaf sheath of rice cultivars inoculated with *Pyricularia* fungi[J]. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1983, 49: 698-703.
- [3] WEI Zhong-min, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor

- of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. Science, 1992,257(5066):85-88.
- [4] RICCI P, Bonnet P, Huet J C, et al. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco[J]. J Eur Biochem, 1989, 183 (3):555-563.
- [5] WANG Y C, Hu D W, Zhang Z G, et al. Purification and immunocytolocalization of a novel *Phytophthora boehmeriae* protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and Chinese cabbage[J]. Physiol & Mol Plant Pathol, 2003, 63: 223-232.
- [6] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method after the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976,72: 248-252.
- [7] BI Yong-mei, Ouyang Guang-cha. Induction effects of elicitor from *Pyricularia oryzae* on enzymes of phenylpropane pathway and chlorogenic acid[J]. Plant Physiol Commun, 1990,29(3): 10-20.
- [8] 邱德文.微生物蛋白农药研究进展[J].中国生物防治,2004,20(2):91-94.  
QIU De-wen. Microbe protein pesticide and it's prospect[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2004, 20(2):91-94.
- [9] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质: 中国专利, CN1344727A [P]. 2002-04-17.  
QIU De-wen. Plant multi-functional fungli protein: China, CN 1344727A[P]. 2002-04-17.
- [10] 张志刚, 邱德文, 官春云, 等. 双向电泳联用质谱技术研究棉苗对细极链格孢菌蛋白激发子诱导的应答[J]. 棉花学报, 2008, 20(6):425-430.  
ZHANG Zhi-gang, Qiu De-wen, Guan Chun-yun, et al. Analysis of the inducing responsiveness in cotton against prainst protein clictor from *Alternaria tenuissima* [J]. Cotton Science, 2008, 20(6):425-430.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.  
LI He-sheng. The experimental principle and technology of physiological-biochemistry in plant[M]. Beijing: Higher Education Publishing House, 2003.
- [12] 刘娟, 王智析. 小麦在叶锈菌侵染过程中过氧化物酶及多酚氧化酶活性变化[J]. 河北农业大学学报, 1989, 12(3):41-46.  
LIU Juan, Wang Zhi-xi. Changes of peroxidase and polyphenol oxidase activities in wheat during infection by leaf rust[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 1989, 12(3):41-46.
- [13] 聂以春, 刘金兰, 夏松波. 棉花杂种一代和二代 SOD 酶和 POD 酶活性及光合特性的研究初报[J]. 棉花学报, 1994, 6(3): 146-150.  
NIE Yi-chun, Liu Jin-lan, Xia Song-bo. Preliminary report on the activity and photosynthetic characteristics of SOD and POD in F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> cotton hybrids (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Cotton Science, 1994, 6(3): 146-150.
- [14] 邱竞, 胡萍, 潘学标. 棉花叶片自然衰老与病害胁迫时 SOD、POD 活性与光合特性的变化[J]. 棉花学报, 1992, 4(1): 57-60.  
QIU Jing, Hu Ping, Pan Xue-biao. Changes of superoxide dismutase, peroxidase activity and photosynthetic characteristics during senescence and disease stress in cotton leaves [J]. Cotton Science, 1992, 4(1): 57-60.
- [15] 陈利锋, 宋玉立, 徐雍皋, 等. 抗感赤霉病小麦品种超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性比较[J]. 植物病理学报, 1997, 27: 209-213.  
CHEN Li-feng, Song Yu-li, Xu Yong-gao, et al. Comparison for activities of superoxied dismutase and catalase between scab resistant and susceptible wheat varieties [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27: 209-213. ●