

大白菜中保护酶活性及 H_2O_2 含量 变化与 TuMV 抗性关系的研究

张志刚¹ 李巧云¹ 刘栓桃¹ 张晓亮² 赵智中¹

(1. 山东省农业科学院 蔬菜花卉研究所, 山东 济南 250100; 2. 山东黎明种业科技有限公司, 山东 济南 250100)

摘要: 选取抗 TuMV 的 8407、河 304 和感 TuMV 的冠 291 和春月黄为试验材料, 于苗期接种 TuMV-C₄ 接种后测定 24 d 内叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT) 这 3 种过氧化氢代谢相关酶的活性以及过氧化氢 H_2O_2 的含量。结果表明: 接种 TuMV 后, POD、CAT 的活性及 H_2O_2 含量的变化在不同材料之间存在明显差异。抗病材料在接种后, POD、CAT 的活性及 H_2O_2 含量虽有变化, 但均能逐渐恢复正常; 感病材料在接种后, POD、CAT 的活性及 H_2O_2 含量均有较大变化, 且始终无法恢复正常。总体而言, 叶片中的 H_2O_2 和 CAT 与大白菜的 TuMV 抗性关系较为紧密, 其次是 POD, 而 SOD 与 TuMV 抗性的关系不大。

关键词: 大白菜; 芜菁花叶病毒; 酶活性; H_2O_2

中图分类号: S634.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)05-0138-06

Study on Relationship between Changes of Protective Enzymes Activity and H_2O_2 Content with TuMV Resistance in Chinese Cabbage

ZHANG Zhi-gang¹, LI Qiao-yun¹, LIU Shuan-tao¹, ZHANG Xiao-liang², ZHAO Zhi-zhong¹

(1. Vegetalbe Reseach Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

2. Shandong Liming Seed Technology Co. Ltd, Jinan 250100, China)

Abstract: The 4 materials 8407(R), He304(R), Guan291(S) and Chunyuehuang(S) which have different resistance to TuMV, were chosen to be the material plants. They were inoculated with TuMV-C₄ at seedling stage. Activities of SOD, POD, CAT and H_2O_2 content from 4 materials were detected within 24 days after being inoculated with TuMV. The results showed that significant differences in the changes of enzymes activities of POD, CAT and H_2O_2 content existed in different materials. The enzymes activities of POD, CAT and H_2O_2 content in resistant materials had some changes with TuMV infection, but could gradually return to normal. The enzymes activities of POD, CAT and H_2O_2 content in susceptible materials all had significant changes, and could not return to normal after being inoculated with TuMV. Overall TuMV resistance of Chinese cabbage had the most closely relationship with H_2O_2 and CAT, and had less relationship with POD, and had no relationship with SOD.

Key words: Chinese cabbage; TuMV; Enzyme activity; H_2O_2

病毒病是大白菜生产中危害最严重的病害之一^[1], 常年发病率保持在 10%~30%, 严重年份甚至可达 80%~90%。经鉴定, 中国大白菜病毒病的毒源主要为芜菁花叶病毒(Tunip mosaic virus, TuMV)^[2]。

病原体侵染植物体后会造成寄主体内活性氧(ROS)的失衡, 进而导致超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和

过氧化氢(H_2O_2)等 ROS 的爆发^[3], 而过量的 ROS 能通过膜脂过氧化作用, 对细胞膜系统造成损伤, 严重时会造成植物细胞死亡^[4]。寄主体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等有清除过量 ROS 的作用, 从而减轻其对细胞膜的损害, 故 Elstner^[5]把上述 3 种酶统称为细胞保护酶。SOD 能清除 $O_2^{\cdot-}$, 同时产生歧化产物

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题项目(2012BAD02B01-6)

作者简介: 张志刚(1977-), 男, 山东茌平人, 助理研究员, 硕士, 主要从事蔬菜育种研究。

通讯作者: 赵智中(1968-), 男, 山东菏泽人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。

H_2O_2 [6-8]; 而 CAT 和 POD 主要是起到酶促降解 H_2O_2 的作用 [9-12]。魏毓棠等 [13] 以大白菜高抗自交系青麻叶 259 和高感自交系油六 4 杂交配制的 F_1 、 F_2 、 BC_1 和 BC_2 为材料, 通过接种 TuMV 后, 发现 POD 与大白菜对 TuMV 的抗性呈正相关, 而 CAT 活性对抗病性影响不显著。曹光亮等 [14] 选用不结球白菜中的不同抗、感品系材料, 通过人工接种 TuMV 进行 POD 活性变化研究, 得出了“潜育期内, 尤其是病毒侵入早期, 寄主体内 POD 活性的增加可作为不结球白菜抗 TuMV 的一种内在因素”的结论。刘琳等 [15] 利用对病毒病有不同抗、感特性的不结球白菜品种为试材, 通过人工接种 TuMV 后, 发现叶片中 SOD 和 CAT 这 2 种酶的活性变化均与抗病性呈正相关。但到目前为止, 还没有将大白菜的 TuMV 抗性与 SOD、POD 和 CAT 这 3 种保护酶以及 H_2O_2 的变化紧密集合的研究报道。

本试验利用不同的抗、感病毒病大白菜材料, 通过苗期人工接种 TuMV, 并于侵染后进行 SOD、CAT 和 POD 这 3 种酶活性和 H_2O_2 含量的测定, 旨在研究 3 种保护酶和 H_2O_2 与大白菜 TuMV 抗性之间的关系, 探讨大白菜抗病毒病的生理机制。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的大白菜材料分别是冠 291、春月黄、8407 和河 304, 皆为高代自交系, 毒源选用 TuMV- C_4 , 所有试材均由山东省农业科学院蔬菜研究所大白菜课题组提供。供试材料对 TuMV- C_4 的抗性分别是, 8407 为高抗, 河 304 为高抗, 冠 291 为高感, 春月黄为感病。

1.2 接种方法

将试材于 2011 年春季分别播种于穴盘中, 待植株长到三叶一心期进行人工接种, 每个材料接种 100 株, 保留等量株数作为对照, 每株接种 2 片叶。接种方法采用摩擦接种法 [16]。

1.3 取样

接种 12 d 后, 感病材料心叶通过目测可看出有明显发病症状, 且在以后的时段内, 病情持续发展, 而抗病材料自始至终都没有出现过发病症状。取样共分 7 次进行, 每次间隔 4 d, 0 d 取健康叶片, 4、8、12 d 取接种叶片, 因 16 d 后接种叶片衰败老化, 故 16、20、24 d 皆取发病叶片(感病材料)或处于相同生长期的叶片(抗病材料)。每个处理重复 3 次。

1.4 测定内容及方法

SOD 活性的测定参照氮蓝四唑(NBT)法 [17],

POD 活性的测定参考改良愈创木酚法 [18], CAT 活性的测定参照叶凡 [19] 的方法; 可溶性蛋白含量, 采用上海荔达生物科技有限公司生产的 BCA 蛋白含量测定试剂盒来测定; H_2O_2 含量, 采用碧云天生物技术有限公司生产的过氧化氢检测试剂盒来测定。

1.5 数据分析

数据统计分析采用 Excel、SPSS 软件, 数据图绘制采用 Origin Pro 8.1 软件。

2 结果与分析

2.1 冠 291 叶片中 3 种保护酶活性及 H_2O_2 含量的变化与 TuMV 浸染的关系

由图 1 可见, 接种病毒后, 处理和对照的 SOD 活性变化趋势基本一致, 差值也不大。处理的 POD、CAT 活性和 H_2O_2 含量(以鲜质量计)与对照相比, 都表现为前低后高。不同的是, POD 的活性变化以 8 d 为界, 二者最大差异出现在 12 d ($P < 0.01$); CAT 的活性变化以 12 d 为界, 二者最大差异出现在第 20 d ($P < 0.01$); H_2O_2 含量变化以 16 d 为界, 二者最大差异出现在 20 d ($P < 0.01$)。接种后, 冠 291 在 12 d 发病。比较处理和对照可发现, 接种后 SOD 的响应并不明显, 因此推断其与 H_2O_2 含量的变化关系不大; POD 和 CAT 在发病前的 8~12 d 比活性急剧升高, 之后也一直明显高于对照; 虽然在刚发病时处理和对照的 H_2O_2 含量差异不大, 但随着处理病情的加重, 其 H_2O_2 含量明显偏高。这说明, 发病后 2 种参与分解 H_2O_2 的酶(POD 和 CAT)的活性虽然明显上升, 但仍然无法抑制 H_2O_2 含量超过正常值, 暗示病毒对冠 291 的破坏已不可逆转。

2.2 春月黄叶片中 3 种保护酶活性及 H_2O_2 含量的变化与 TuMV 浸染的关系

由图 2 可见, 处理和对照的 SOD 活性呈反相-同相-反相的变化趋势, 二者最大差异出现在 24 d ($P < 0.01$)。处理和对照的 POD 活性变化趋势基本一致, 只是处理的波动显著高于对照, 二者最大差异出现在 12 d ($P < 0.01$)。处理和对照的 CAT 活性变化趋势, 除 4~16 d 为反向变化外, 其余时段均较为一致, 二者最大差异出现在 8 d ($P < 0.01$)。处理与对照的 H_2O_2 含量变化趋势在 4 d 前基本重叠, 4~20 d 处理缓慢上升, 于 20 d 达到一个小高峰, 对照则剧烈起伏。接种后, 春月黄在 12 d 发病。对比处理和对照可发现, 接种后 SOD 响应比较迅速, 但在处理和对照中, 均找不出 SOD 和 H_2O_2 变化趋势之间的直接联系; POD 与 H_2O_2 的变化趋势在 4 d 之后趋于吻合; CAT 与 H_2O_2 的变化趋势在 4 d 之前和

16 d 之后均较为一致;考虑到 POD 和 CAT 都有分解 H_2O_2 的功能,将二者的活性变化综合考虑,则与 H_2O_2 的含量变化十分吻合,且 CAT 起主要作用,POD 起次要作用。 H_2O_2 含量虽然一直被抑制得很

低,但始终无法恢复到正常(对照)水平,暗示春月黄对病毒有一定的抗病性,病毒的破坏因寄主的抗病性而有所放缓。但一旦感病便再也无法恢复正常。

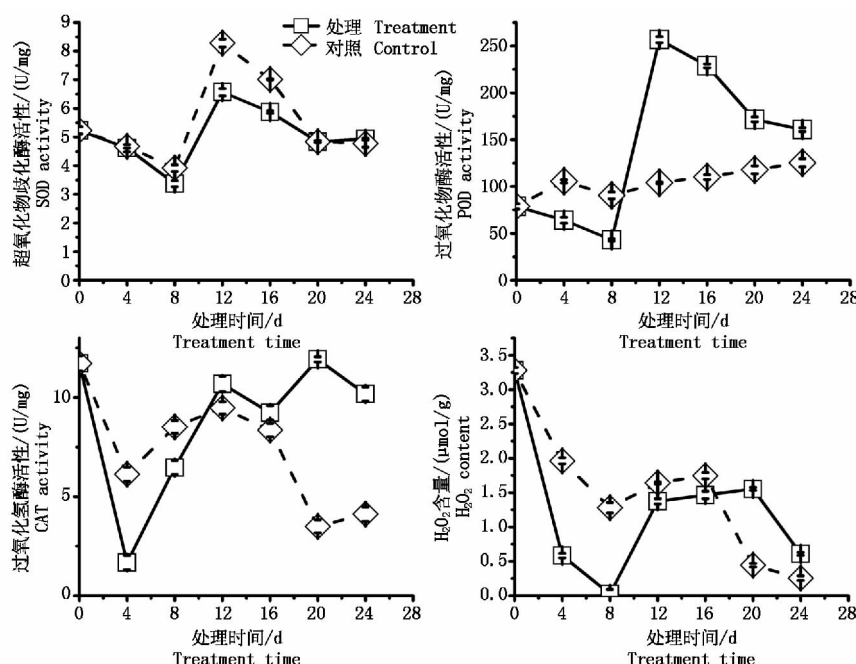


图1 冠291接种TuMV后SOD、POD、CAT活性及 H_2O_2 含量的变化

Fig. 1 Changes of specific activities of SOD, POD, CAT and H_2O_2 content of the Guan 291 after being inoculated with TuMV

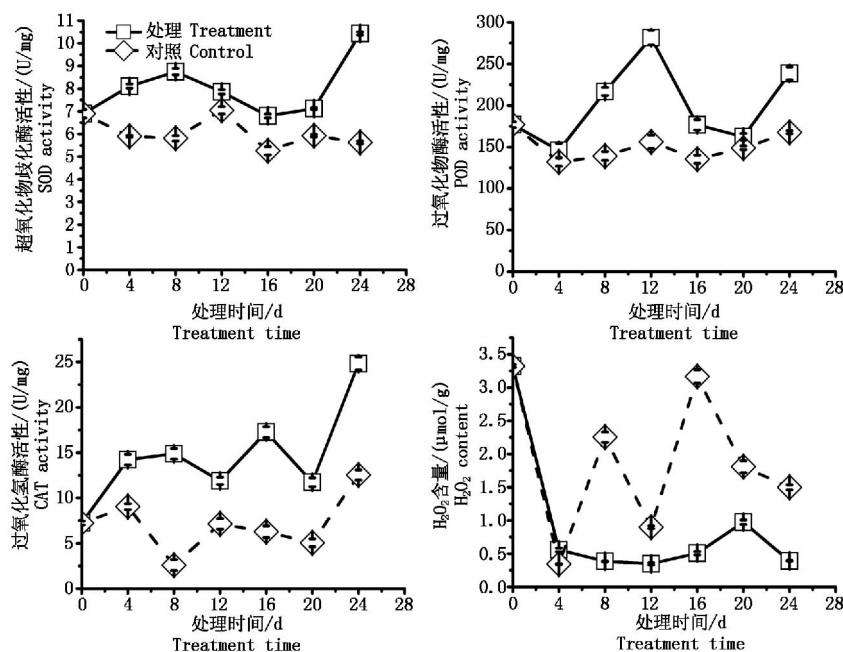


图2 春月黄接种TuMV后SOD、POD、CAT活性及 H_2O_2 含量的变化

Fig. 2 Changes of specific activities of SOD, POD, CAT and H_2O_2 content of the Chunyuehuang after being inoculated with TuMV

2.3 8407 叶片中 3 种保护酶活性及 H_2O_2 含量的变化与 TuMV 浸染的关系

由图 3 可见,处理和对照的 SOD 活性变化趋势基本一致。相对于对照的 POD 活性总是小幅变化

而言,处理的 POD 活性在 12 d 前后出现了一次大的波动,但很快恢复正常。12 d 时,处理的 CAT 活性超过了对照 ($P < 0.01$),且此后一直接近于后者。处理的 H_2O_2 含量在接种后的前 12 d 内持续下降,

而对照一直在正常水平附近波动,二者最大差异出现 12 d ($P < 0.01$), 16 d 后二者较为接近。接种后, 8407 始终没有发病。对比处理和对照可发现, SOD 活性只是在 12 d 前后出现了一次较大波动, 表明 SOD 和 H_2O_2 的变化趋势之间无明显关联; 处理的 POD 活性也只是在 8 ~ 16 d 时段内出现了一次大幅波动, 结合 H_2O_2 含量的变化来看, POD 发挥了一定的清除 H_2O_2 的功能; CAT 的活性变化与 H_2O_2 含量

变化较为一致, 特别是在前 20 d 内, 说明 CAT 在代谢 H_2O_2 的过程中发挥了主要作用; 处理和对照的 H_2O_2 含量虽然在前期表现出较大差异, 但到 16 d 时, 二者就基本一致了, 这和 POD、CAT 活性恢复至正常状态的时间点非常吻合。POD 等各项指标在很短的时间内 (16 d) 就恢复正常, 暗示 8407 对病毒有较强的抗性, 病毒仅能在短时间内对植株造成有限的伤害, 随着时间的推移, 植株能逐渐恢复正常。

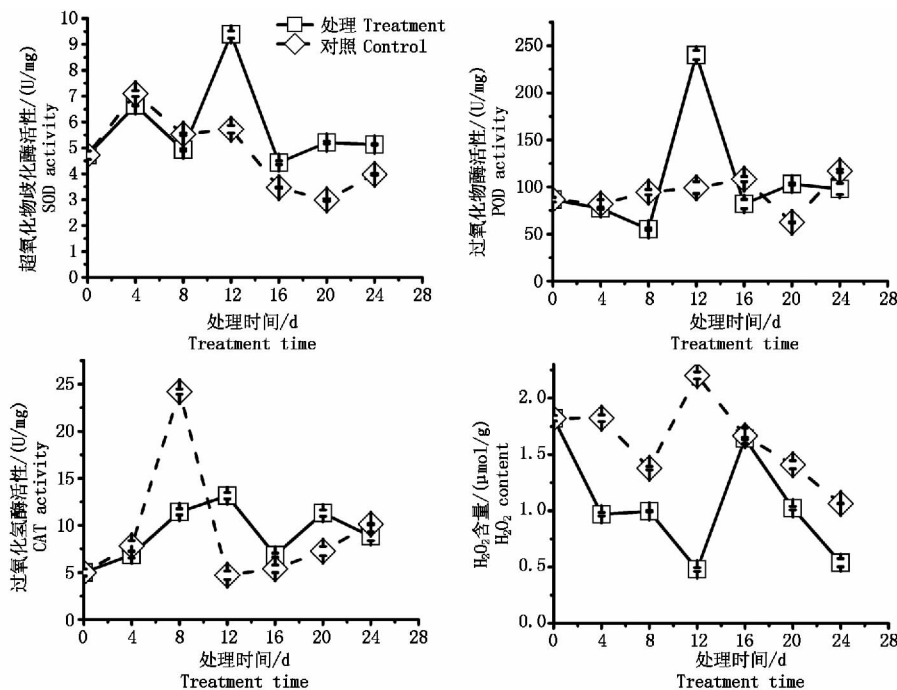


图 3 8407 接种 TuMV 后 SOD、POD、CAT 活性及 H_2O_2 含量的变化

Fig. 3 Changes of specific activities of SOD, POD, CAT and H_2O_2 content of the 8407 after being inoculated with TuMV

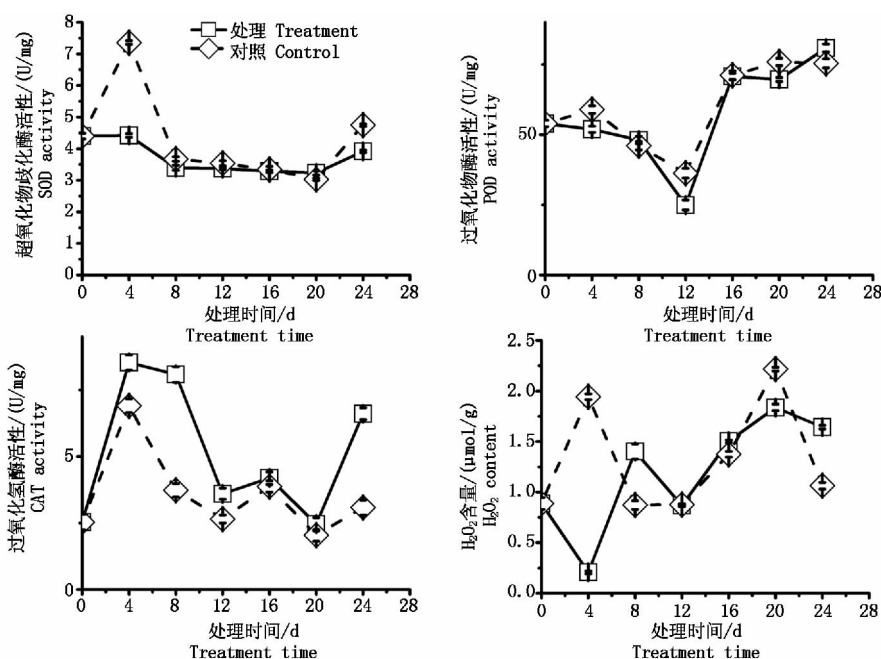


图 4 河 304 接种 TuMV 后 SOD、POD、CAT 活性及 H_2O_2 含量的变化

Fig. 4 Changes of specific activities of SOD, POD, CAT and H_2O_2 content of the He304 after being inoculated with TuMV

2.4 河 304 叶片中 3 种保护酶活性及 H_2O_2 含量的变化与 TuMV 浸染的关系

由图 4 可见,处理和对照的 SOD 活性变化趋势基本吻合,且在大部分时段内,二者数值基本重合。处理的 POD 活性在大部分时间内和对照差别很小,只是总体稍低于对照,二者最大差异出现在 12 d。处理和对照的 CAT 活性变化趋势基本一致。处理与对照的 H_2O_2 含量以 12 d 为界,之前趋势相反,之后基本一致且数值较为接近,二者最大差异出现在 4 d ($P < 0.01$)。接种后,河 304 始终没有发病。对比处理和对照可发现,接种后 SOD 等 3 种酶除在个别时间点与对照有一些差异外,几乎没有响应; H_2O_2 的含量除开始阶段与对照差异较大,之后很快恢复正常。这表明 SOD 等 3 种酶的活性变化与 H_2O_2 的含量变化均没有直接关系;接种后,处理和对照的酶活性和 H_2O_2 含量产生了一定差异,但迅速趋于一致,暗示河 304 对病毒近乎免疫。

3 讨论

研究表明, H_2O_2 、CAT 与大白菜的 TuMV 抗性关系较为紧密,其次是 POD,而 SOD 与 TuMV 抗性的关系不大。接种后,抗病材料的 POD、CAT 的活性及 H_2O_2 含量虽有变化,但均能逐渐恢复正常;而感病材料的上述指标均变化较大,且始终无法恢复正常。

本研究中 2 个抗病材料处理叶片中的 H_2O_2 含量都出现了前期和对照相反,后期恢复一致的现象,区别在于河 304 在 12 d 即恢复正常,而 8407 推迟到 16 d,由此可归结为抗性越强, H_2O_2 含量就越早恢复正常。而 2 个感病材料在发病后,处理的 H_2O_2 含量和对照相比都表现出显著差异,且始终无法恢复正常。不同的是,冠 291 发病后叶片中的 H_2O_2 含量明显高于对照,暗示冠 291 很快就丧失了对 TuMV 的抵抗。而春月黄叶片中的 H_2O_2 含量一直明显低于对照,暗示春月黄对 TuMV 有一定的忍耐能力。以上表明, H_2O_2 确实和大白菜抗 TuMV 有密切关系,但是,接种后大白菜叶片中 H_2O_2 含量的升高和降低均非抗 TuMV 的标志,只有其能否尽快恢复正常才是抗 TuMV 的重要参考指标。

2 个抗病材料的 CAT 比活性都是 12 d 前波动较大,而 12 d 后对照与处理的 CAT 比活性交织在一起,说明寄主-病原体互作体系趋于稳定,TuMV 的侵染已被有效控制。随着 TuMV 的持续侵染,高感材料冠 291 后期出现组织严重受损乃至死亡,导致 CAT 比活性下降,近而无法充分代谢 H_2O_2 。感病材

料春月黄的 CAT 比活性始终处于高位,一直把 H_2O_2 代谢至很低水平,暗示其耐病性只能减缓 TuMV 的侵染而不是遏制,导致其 CAT 比活性一直无法恢复至对照水平。本研究中,CAT 比活性和 H_2O_2 含量之间存在明显的相关性,说明 CAT 在大白菜抵御 TuMV 侵害的过程中发挥了一定的作用。

POD 和 H_2O_2 在本研究中体现出一定的相关性,证明了 POD 确有清除部分 H_2O_2 的功能。另外,POD 参与木质素的合成^[20-21],而木质素对于病原体是有毒的,同时细胞壁的高度木质化对病原体的侵染和扩展也有一定的限制作用^[22-25]。接种 TuMV 后,感病材料 POD 比活性的升高时间和速度都明显高于抗病材料,原因可能是感病材料自身的抵抗能力不及抗病材料,受侵染后细胞壁严重受损,POD 活性明显升高可以帮助修复受损的细胞壁。

参考文献:

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 刘棚平, 路文长. 中国十省(市)十字花科蔬菜芜菁花叶病毒(TuMV)株系分化研究[J]. 科学通报, 1989, 34(21): 1660-1664.
- [3] John J G, Gary J L. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. Plant Physiol, 2000, 124(1): 21-29.
- [4] Van C W, Van M M, Inze D. H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance [J]. Trends Plant Sci, 1998, 3(9): 330-334.
- [5] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1982, 33: 73-96.
- [6] 陈鸿鹏, 谭晓风. 超氧化物歧化酶(SOD)研究综述[J]. 经济林研究, 2007(01): 59-65.
- [7] 曹淑华, 查向东. 超氧化物歧化酶研究综述[J]. 安徽农业科学, 2003(04): 599-601.
- [8] 杜秀敏, 殷文璇, 张慧, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003(01): 48-50.
- [9] 南芝润, 范月仙. 植物过氧化氢酶的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2008(05): 27-29.
- [10] 刘稳, 李杨, 高培基, 等. 过氧化物酶研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2000(02): 50-64.
- [11] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001(04): 332-344.
- [12] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005(05): 223-224.
- [13] 魏毓棠, 赵国余, 陶正平, 等. 大白菜对芜菁花叶病毒抗性同生理生化相关性状的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1991(02): 91-96.
- [14] 曹光亮, 曹寿椿. 对 TuMV 不同抗性的不结球白菜接

- 种后过氧化物酶的变化[J]. 南京农业大学学报, 1992(02): 134-137.
- [15] 刘琳, 侯喜林, 王利英, 等. 不结球白菜感染芜菁花叶病毒后 4 种防御酶活性变化及其抗病相关性[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 14-18.
- [16] 李巧云, 张志刚, 成文华, 等. 利用 ELISA 方法鉴定大白菜 TuMV 抗性[J]. 科技导报, 2009(01): 42-45.
- [17] 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, 2000.
- [18] 李忠光, 龚明. 愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进[J]. 植物生理学通讯, 2008(02): 323-324.
- [19] 叶凡, 侯喜林, 袁建玉. 高温胁迫对不结球白菜幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. 江苏农业学报, 2007(02): 154-156.
- [20] Huystee R B V. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1987, 38(7): 205-219.
- [21] Graham M Y, Graham T L. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* Wall Glucan[J]. Plant Physiol, 1991, 97(4): 1445-1455.
- [22] Lewis N G, Yamamoto E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1990, 41: 455-496.
- [23] Nicholson R L, Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 1992, 30: 369-389.
- [24] 李巧云, 张志刚, 刘栓桃, 等. 大白菜芜菁花叶病毒病抗性遗传分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 135-139.
- [25] 曾钢, 叶艳英, 闫晓红, 等. 简化一步多重 RT-PCR 法快速检测芜菁花叶病毒[J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 102-107.

欢迎订阅 2014 年《麦类作物学报》

《麦类作物学报》是由教育部主管、西北农林科技大学和国家小麦工程技术研究中心联合主办的专业性学术期刊,也是全国唯一的一份麦类作物专刊。主要刊载麦类作物(小麦、大麦、燕麦、黑麦等)遗传育种、生理生化、栽培管理、食品加工、产品贸易等方面有创见性的学术论文、领先水平的科研成果、学术报告、有新意的文献综述以及学术动态等。读者对象为国内外农业科技人员、农业院校师生及高级农业技术推广和管理人员。

《麦类作物学报》为“农业科学中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国科技精品期刊”,现已被英国《国际农业与生物技术文摘》数据库(CABI)、美国《化学文摘》数据库(CA)、美国《剑桥科学文摘》数据库(CSA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)数据库、日本《科学技术》数据库(JST)、波兰《哥白尼索引》数据库(IC)、《中国科学引文数据库》(核心库)等国内外多家权威性检索系统收录。影响因子排名已连续 3 年居全国农业期刊前 10 位。

《麦类作物学报》自 2014 年改为月刊,每月中旬出版,定价 20.00 元/册,全年 240 元,国内刊号:CN61-1359/S,国际刊号:1009-1041。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:52-66。漏订者可直接汇款至编辑部补订。国外总发行:北京 中国国际图书贸易总公司,代号:1479B。

热忱欢迎国内外专家随时指导和赐稿,亦欢迎各有关课题组、单位和个人出版专辑、刊登广告。

通讯地址:陕西杨凌 邠城路 3 号《麦类作物学报》编辑部

邮 编:712100

联 系 人:华千勇

电 话:(029) 87082642(兼传真)

网 址:<http://www.tcrop.net>; <http://mlzwx.b.ajjournals.ac.cn/>