

大豆与灰斑病菌互作早期防卫酶及可溶性蛋白的表达特征^{*}

高学文¹ 杨 春¹ 樊建坤¹ 丁俊杰² 郑天琪² 马淑梅²

(1. 南京农业大学农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095;
2. 黑龙江省农业科学院合江农业科学研究所, 佳木斯 154007)

摘要 用大豆同一品种与不同灰斑病菌生理小种和不同品种与同一生理小种互作, 测定了大豆叶片防卫酶及可溶性蛋白的表达特征。结果表明, 大豆品种与不同亲和性的小种互作后 POD 和 SOD 活性都有增强, 但非亲和互作中防卫酶活性增加的速度和强度显著高于亲和互作。POD 和 SOD 同工酶谱带仅发生强弱变化, 未见有数量改变, 说明 POD 和 SOD 活性的增加与同工酶活性的增强有关。可溶性蛋白电泳图谱显示, 在非亲和或亲和互作中大豆某些可溶性蛋白谱带有所增强, 是一些病程相关蛋白。而大豆不同品种与灰斑病菌同一生理小种互作后 POD 快速而显著表达也与大豆和灰斑病菌的非亲和性相关。上述结果表明防卫酶 POD 和 SOD 活性的快速而显著增高是大豆与灰斑病菌非亲和互作的特征。

关键词 大豆; 灰斑病菌; 互作; 防卫酶; 同工酶; 可溶性蛋白

中图分类号 S 432.2⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2003)03—0193—04

防卫酶在植物抗病反应中的作用已有很多报道^[1-3]。有关大豆与灰斑病菌互作中防卫酶的变化研究较少, 已有研究通常是用灰斑病菌来感染不同抗病性的品种, 由于品种本身的差异及互作的复杂性使得研究结果不尽一致。本研究主要采用同一品种与不同亲和性小种互作, 分析防卫酶和可溶性蛋白的表达特征, 探讨防卫酶在大豆抗灰斑病中的作用, 为大豆的抗病或感病生理机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种为合丰 22、25、26、27 和 29 号。灰斑病菌 1 号和 10 号生理小种。大豆品种与灰斑病菌的互作关系如表 1。

1.2 接种与取样

大豆每品种播 10 盆 (40cm×40 cm), 每盆 10 株。当植株第 2 片复叶完全展开时, 用灰斑病菌 1 号和 10 号小种分别喷雾接种大豆叶片, 接种后遮光保湿 24 h。取样时间分别为 0(CK)、12、24、48、72、

120 h。

表 1 大豆品种与灰斑病菌的互作关系 ^[4] Table 1 The phenotype of interaction between soybean and <i>Cercospora sojina</i>					
	合丰 22 号	合丰 25 号	合丰 26 号	合丰 27 号	合丰 29 号
1 号小种	S	S	S	R	R
10 号小种	—	—	—	—	S

注: R—非亲和; S—亲和

1.3 防卫酶活性的测定

过氧化物酶(POD)活性测定及同工酶凝胶电泳分析分别采用愈创木酚法^[3,5]和乙酸联苯胺法^[2]; 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定及同工酶凝胶电泳分析采用 NBT 法, 分别参照文献^[6]和^[7]的方法。

1.4 可溶性蛋白 SDS—PAGE 分析

参照文献^[8]的方法, 分离胶浓度为 10%。

2 结果与分析

2.1 合丰 29 号与灰斑病菌互作后叶片 POD 活性及同工酶电泳图谱

合丰 29 号接种灰斑病菌 1 号和 10 号生理小种

^{*} 收稿日期: 2003—02—18
基金项目: 霍应东青年教师基金(81027)。
作者简介: 高学文(1965—), 男, 副教授, 博士, 从事植物与病原物互作分子机理和植物病害生物防治研究。E-mail: gaoxuew@yahoo.com
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后,不同时间的 POD 活性和同工酶图谱见图 1。结果显示,合丰 29 号与 1 号小种的非亲和互作中 POD 活性在 24 h 出现第一峰,与对照相比增加 12.5%,在互作 72 h 后出现第二峰,与对照相比增加 104.2%;而与 10 号小种的亲和互作中,POD 活性仅在 48 h 出现一个峰,与对照相比增加 8.3%,而

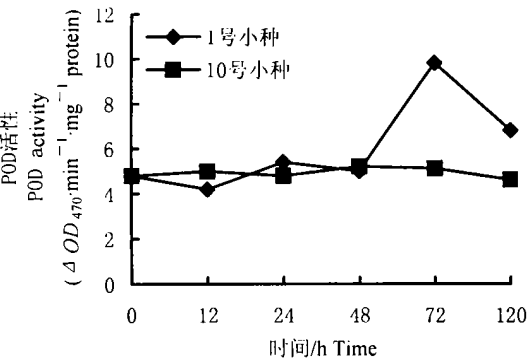


图 1 合丰 29 号与灰斑病菌互作后叶片 POD 活性(A)及同工酶电泳图谱(B)

Fig. 1 POD activity (A) and electrophoresis spectrum of POD isoenzyme (B) in interaction between Hefeng 29 and *Cercospora soja* strains

酶活性增强有关。

2.2 合丰 29 号与灰斑病菌互作后叶片 SOD 活性及同工酶电泳图谱

合丰 29 号与 1 号小种非亲和互作后 SOD 活性在 12 h 出现第一峰,在互作 72 h 出现第二峰,分别

到 120 h 后,POD 活性又回落到初始水平(图 1, A)。由此可见,POD 活性的显著增加是与非亲和互作相关的。同工酶图谱(图 1, B)显示,在非亲和或亲和互作中未发现有同工酶谱带数量的增减,但 Rf 值为 0.46、0.52、0.59 和 0.76 的谱带在非亲和互作中明显增强,说明 POD 活性的增加与已有同工

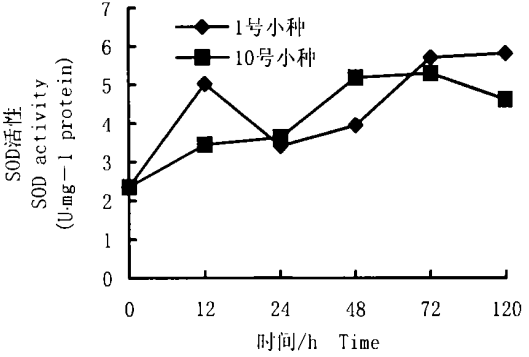


图 2 合丰 29 号与灰斑病菌互作后叶片 SOD 活性(A)及同工酶电泳图谱(B)

Fig. 2 SOD activity (A) and electrophoresis spectrum of SOD isoenzyme (B) in interaction between Hefeng 29 and *Cercospora soja* strains

为对照的 2.13 和 2.41 倍;而与 10 号小种亲和互作后,SOD 活性持续缓慢增高,在 48 h 出现一个峰,为对照的 2.19 倍,到 72 h 之后开始回落(图 2, A)。这表明 SOD 活性快速而显著增加是与非亲和互作相关的。同工酶图谱(图 2, B)显示,合丰 29 号无论

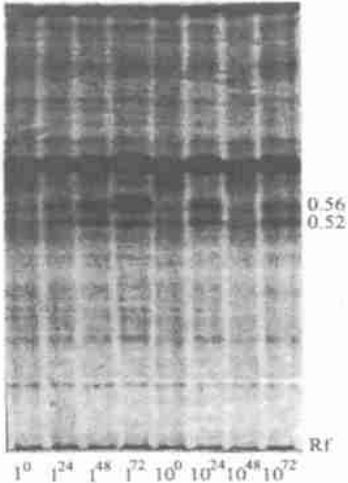
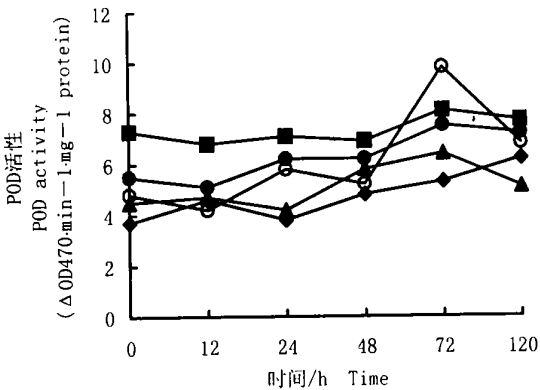


图 3 合丰 29 号与灰斑病菌互作后叶片可溶性蛋白电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis spectrum of soluble protein in interaction between Hefeng 29 and *Cercospora soja* strains

与非亲和或亲和小种互作 SOD 同工酶谱带数量都未发生增减,SOD 活性的增加与同工酶活性增加有关。



—◆— 合丰 22;—■— 合丰 25;—▲— 合丰 26; —●— 合丰 27;—○— 合丰 29

图 4 不同大豆品种与灰斑病菌 1 号生理小种互作后的 POD 酶活性

Fig. 4 POD activity of soybean cultivars in interaction with *Cercospora soja*

2.3 合丰 29 号与灰斑病菌互作后叶片可溶性蛋白电泳图谱

可溶性蛋白 SDS—PAGE 图谱(图 3)显示,合丰

29 号与灰斑病菌非亲和或亲和互作后某些可溶性蛋白含量有所增加, 这些蛋白可能与抗病性或感病性相关。其中非亲和互作中 Rf 为 0.52 和 0.56 的蛋白谱带明显增强, 它们可能与防卫反应相关。

2.4 不同大豆品种与灰斑病菌互作后叶片 POD 活性及同工酶谱带

为确定不同品种与单一小种互作后 POD 活性和同工酶谱带的表达特征, 我们用合丰号系列大豆品种与灰斑病菌 1 号生理小种互作。各品种与灰斑病菌 1 号小种的亲和关系见表 1。结果表明(图 4), 未接种时各品种的 POD 活性具有差别, 接种灰斑病菌后各品种的 POD 活性都增高, 但在非亲和互作中

合丰 27 和 29 号的 POD 活性在互作 24 h 和 72 h 后分别有一个峰值, POD 活性增高的速度和强度明显高于亲和互作, 表明品种与小种间的亲和性与 POD 活性的表达相关。同工酶图谱(图 5)显示, 非亲和互作中合丰 27 和 29 号同工酶都有显著增高, 而亲和互作中的合丰 22、25 和 26 号同工酶未见有明显的规律性。值得一提的是, 抗多小种的合丰 27 和 29 号的 POD 谱带与感多小种的合丰 22、25 和 26 号的 POD 谱带明显不同, 前者只有一条 Rf 值为 0.76 的特异谱带, 而后者在相应位置却有两条 Rf 值分别为 0.72 和 0.78 的特异谱带, 这一不同可能与大豆的抗、感病相关。

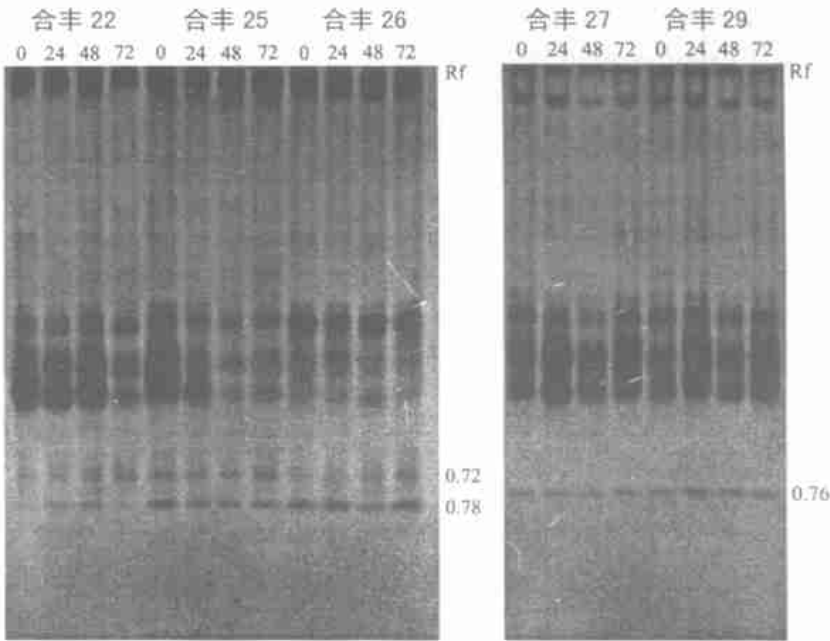


图 5 不同大豆品种与灰斑病菌 1 号生理小种互作后 POD 同工酶图谱

Fig. 5 Electrophoresis spectrum of POD isoenzyme of soybean cultivars in interaction with *Cercospora sojina*

3 讨论与结论

大豆与灰斑病菌互作符合“基因对基因”关系。刘忠堂等^[9]研究表明大豆对灰斑病 1 号小种的抗性是由一对基因控制的简单遗传。理论上, 大豆抗病基因编码的受体与灰斑病菌无毒基因编码的特异性激发子识别后, 通过信号传导启动防卫反应。该过程是在很短时间内完成的, 从而决定寄主与病原物的亲和反应。故本研究在时间上选择了大豆与灰斑病菌互作的早期。研究结果表明防卫酶 POD 和 SOD 活性的迅速增高是与非亲和互作相关的。

防卫酶 POD、SOD 等在大豆抗病中的作用已有一些研究。周博如等^[10]研究了不同抗性的大豆品

种感染细菌性疫病后 POD、PPO 的变化, 结果显示不同品种的 POD 活性均升高, 其中抗病品种的 POD 活性处于较高水平。魏爱丽等^[1]对盐胁迫大豆愈伤组织 SOD 活性和同工酶变化的研究表明愈伤组织在含盐培养基短时间培养时 SOD 活性增高。郑翠明^[11]等研究表明在大豆种皮感染 SMV 后, 抗斑驳品种健株种皮 POD、SOD 活性高于感斑驳品种。这些研究结果表明防卫酶的表达是与植物抗逆性相关的。而张丽娟等^[12]研究结果显示不同大豆品种感染灰斑病菌后叶片中 POD 均有所增加, 抗感品种之间 POD 活性变化差异没有明显的相关性。本研究结果表明, 大豆与灰斑病菌非亲和互作中 POD 活性和 SOD 活性增加的速度和强度明显比亲和互作高, 说明 POD 和 SOD 在大豆抗灰斑病中起重要作用。

研究结果有所差异可能与品种和取样时间不同有关。POD 和 SOD 被认为在植物防卫反应中具有作用,是源于 POD 可以将酚类氧化成对病原菌具有高毒性的醌类物质并使木质素沉积,而 SOD 在清除活性氧,避免膜损伤方面起着重要作用。但是,植物的防卫反应是多层次,所以不能以单一的防卫酶活性的变化作为标准来衡量大豆的抗感病性。此外,本研究中大豆与灰斑病菌亲和或非亲和互作后一些可溶性蛋白含量明显增强,尤其在非亲和互作中显著增加的蛋白可能与抗病有关,对这些蛋白的进一步研究,将是克隆抗病相关基因的一条途径。

参 考 文 献

- 1 魏爱丽,白桦,陈云昭,等.盐胁迫下大豆初生叶愈伤组织 SOD 活性及其同工酶变化的研究[J].大豆科学,1999,18(1):85—88.
- 2 徐朗莱,叶茂炳.过氧化物酶及其同工酶与小麦抗赤霉病性的关系[J].植物病理学报,1991,21(4):285—289.
- 3 高学文,沈波,齐放军,等.在水稻悬浮细胞系中非亲和白叶枯病菌繁殖受到抑制的现象及其机理的研究[J].植物病理学报,

2001,31(2):117—122.

- 4 马淑梅,李宝英,高学文,等.黑龙江省大豆主要推广品种及资源对灰斑病抗性谱测定结果初报[J].黑龙江农业科学,1992(5):24—26.
- 5 张志良.植物生理学实验指导[M].第2版.北京:高等教育出版社,1995.
- 6 王爱国,罗广华,邵从本,等.大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J].植物生理学报,1983,9:77—83.
- 7 罗广华,王爱国.植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J].植物生理学通讯,1983(6):44—45.
- 8 J. 萨穆布鲁克,费里奇 E. F.,曼尼阿蒂斯 T. 著.金冬雁,黎孟枫译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1992,882—885.
- 9 刘忠堂,黄桂潮.抗灰斑病大豆新品种选育[J].中国农业科学,1986,3:26—30.
- 10 周博如,刘太国,杨微,等.不同抗性的大豆品种感染细菌性疫病后 POD、PPO 变化的研究[J].大豆科学,2002,21(3):183—186.
- 11 郑翠明,滕冰,高凤兰,等.感染 SMV 后大豆种皮超氧化物歧化酶、过氧化物酶和多酚氧化酶的变化[J].中国农业科学,1999,32(1):99—101.
- 12 张丽娟,杨庆凯,张彩英.大豆感染灰斑病后过氧化物酶活性的变化[J].大豆科学,2002,21(3):172—176.

THE EXPRESSION CHARACTER OF DEFENSE ENZYMES AND SOLUBLE PROTEINS IN THE EARLY INTERACTION BETWEEN SOYBEAN AND *Cercospora soja*

Gao Xuewen¹ Yang Chun¹ Fan Jiankun¹ Ding Junjie² Zheng Tianqi² Ma Shumei²

(1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 2. Institute of Hejiang Agricultural Science Research, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi 154007)

Abstract Expression character of defense enzymes and soluble proteins in the interaction between soybean single variety and *Cercospora soja* different strains or different varieties and single strain were assayed. Results showed that POD and SOD activity in both incompatible or compatible interaction were increased, but the increase of POD and SOD activity in incompatible interaction was higher and faster than that in compatible interaction, while the number of isoenzyme bands was not changed in both interaction, that implied the increase of POD and SOD activity was related with increase of isoenzymes activity. Electrophoresis showed that some soluble proteins were increased in both incompatible and compatible interaction, they are pathogenesis—related proteins (PR protein). The fast and marked expression of POD activity in the soybean varieties which was inoculated with single strain is also related with incompatibility of soybean and *Cercospora soja*. The results indicate that fast and marked increase of defence enzymes POD and SOD activity is a character of incompatible interaction between soybean and *Cercospora soja*.

Key words Soybean; *Cercospora soja*; Interaction; Defense enzymes; Isoenzyme; Soluble protein