

转 RS-AFP2 辣椒接种疫霉菌后生化指标的响应研究

贺炜华^{1,2}, 刘媛^{1,2}, 曾富华^{2,1} 陈信波¹, 黄真池^{1,2}

(1. 湖南农业大学 生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要:以保加利亚尖椒为对照,在接种疫霉菌前后,对转 RS-AFP2 辣椒进行病情调查,并对叶片中的 SOD、POD、PPO、PAL、SOD 同工酶和 POD 同工酶进行分析,检测转 RS-AFP2 辣椒的抗病性效果。结果表明:①保加利亚尖椒在接种后 SOD 活性立即开始上升,第 3 天后开始下降,在第 7 天表现出疫霉病症状,转 RS-AFP2 辣椒在接种后 24 h 才开始上升,第 7 天开始下降,不表现发病病症;②接种前,转 RS-AFP2 辣椒 POD 活性明显高于保加利亚尖椒,接种后第 5 天保加利亚尖椒开始高于转 RS-AFP2 辣椒;③无论在接种前还是接种后,转 RS-AFP2 辣椒 PPO 和 PAL 酶活都明显高于保加利亚尖椒;④转 RS-AFP2 辣椒和保加利亚尖椒在接种前和接种后,SOD 同工酶条带数都一样,无变化;⑤保加利亚尖椒在接种后 POD 同工酶增加 2 条带,转 RS-AFP2 辣椒增加 1 条带,最终两者都表现出 4 条带。

关键词: 疫霉病; SOD; POD; PPO; PAL; 同工酶

中图分类号: S 641.3; S 603.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0157-04

辣椒疫霉病,又称辣椒黑茎病,是辣椒疫霉菌侵染辣椒韧皮部导致辣椒死亡的一种土传性疾病,严重影响辣椒广泛栽培,给生产上带来严重损失。其发病率一般在 10%~30%,严重时可达 50%~60%以上^[1],通过基因工程技术培育转基因辣椒抗病新品种是防治该病害最有效的途径之一。该实验室前期工作已经获得了转 RS-AFP2 辣椒,该试验对转 RS-AFP2 辣椒接种疫霉菌后叶片中生化指标进行测定分析,以分析已获得的转 RS-AFP2 辣椒的抗病性效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 辣椒种子:转 RS-AFP2 辣椒种子,由该实验室保存;保加利亚尖椒种子,由市场上购买;供试菌种:辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* Leon.),由广东海洋大学生物技术重点实验室提供。

1.1.2 试剂 邻苯三酚、邻苯二酚、愈创木酚、过氧化氢、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、巯基乙醇、甘油、L-苯丙氨酸、联苯胺、冰醋酸、氯化铵、氯化硝基四氮唑(NBT)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、核黄素、丙烯酰胺(Acr)、过硫酸铵、甘氨酸等。

第一作者简介:贺炜华(1983-),男,湖南常德人,硕士,现主要从事植物基因工程研究。E-mail: hwhandw@yahoo.com.cn

通讯作者:曾富华。E-mail: zengfuhua@gmail.com

基金项目:广东省科技攻关资助项目(2006B20101011);广东省自然科学基金资助项目(5011730)。

收稿日期:2008-07-30

1.1.3 培养基 采用 PDA 培养基 200 g 马铃薯去皮,切成小块,加入蒸馏水 1 000 mL,煮沸 30 min,4 层纱布过滤,加水补足 1 000 mL,再加葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,融化后分装,121℃灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 辣椒育苗 辣椒种子用 50~55℃温水浸泡 6~8 h,播种于培养皿中,26℃人工气候箱中催芽,成苗后移栽到花盆中,温室内正常水肥管理。

1.2.2 转 RS-AFP2 辣椒的筛选 转 RS-AFP2 辣椒子一代成苗后,取叶片提基因组 DNA,进行 PCR 检验是否含有目的基因,筛选出具有 RS-AFP2 基因的子一代植株。

1.2.3 疫霉菌孢子悬浮液的制备 待培养皿布满疫霉菌菌丝后,向培养皿中加 10 mL 无菌水,4℃放置 30 min,诱导游动孢子的释放,室温光照 2 h 后,用毛笔刷洗培养基表面,双层纱布过滤,收集游动孢子,调整浓度到游动孢子 10 000 个/mL。

1.2.4 接种及取样 待辣椒长至开花初期,用孢子悬浮液灌根法接种,每株 3 mL,调查病情。在接种前、接种后第 1、3、5、7、9 天分别取样。测定叶片酶活,3 次重复,取平均值;同时对采取的叶片进行同工酶电泳分析。

1.2.5 酶活测定以及同工酶电泳分析 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参考 Marland 等^[2]的方法;苯丙氨酸解氨酶(PAL)和多酚氧化酶(PPO)活性测定参考梁军锋等^[3]的方法;过氧化物酶(POD)活性测定参考潘建菁等^[4]的方法;超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)同工酶电泳分析参考袁庆华等^[5]的方法。

2 结果

2.1 转 RS-AFP2 辣椒的筛选

PCR 结果表明,通过播种得到的 11 株转 RS-AFP2 辣椒子一代植株都含有大小为 250 bp 的条带,与 RS-AFP2 基因的大小一致(图 1)。

2.2 接种疫霉菌后病情调查

通过病情调查发现,保加利亚尖椒在接种后的第 7 天植株开始萎蔫,茎秆开始变黑;而转 RS-AFP2 辣椒却

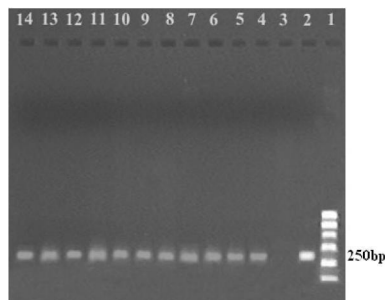


图 1 转 RS-AFP2 辣椒子一代植株 PCR 电泳图

注:泳道 1: Marker; 泳道 2: 阳性对照, RS-AFP2/PC-Ti 质粒;

泳道 3: 阴性对照, 保加利亚尖椒; 泳道 4-14: 转 RS-AFP2 子一代植株。

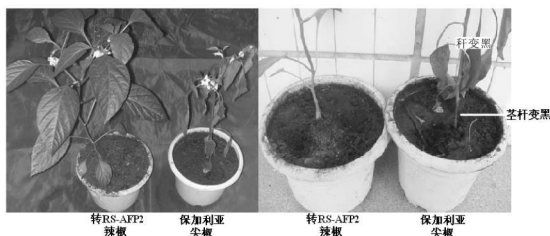


图 2 接种第 7 天辣椒表现症状

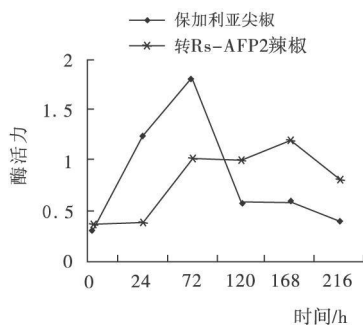


图 3 接种疫霉菌后 SOD 活性变化

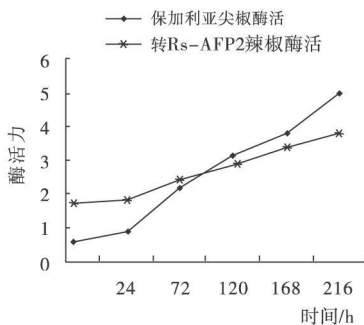


图 4 接种疫霉菌后 POD 活性变化

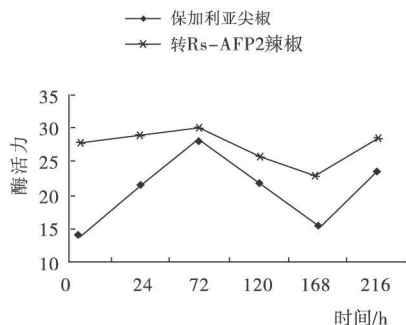


图 5 接种疫霉菌后 PPO 活性变化

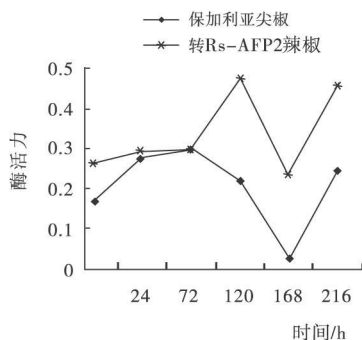


图 6 接种疫霉菌后 PAL 活性变化

2.3.2 接种疫霉菌后 POD 活性变化 接种前,转 RS-AFP2 辣椒 POD 活性明显高于保加利亚尖椒;接种后,保加利亚尖椒 POD 活性急剧上升,从第 5 天起开始高

没有表现出疫霉病症状(图 2)。

2.3 酶活测定

2.3.1 接种疫霉菌后 SOD 活性变化 保加利亚尖椒在接种后 SOD 活性立即开始上升,于第 3 天后开始下降,而转 RS-AFP2 辣椒接种疫霉菌后,其 SOD 活性在接种后 24 h 开始表现出上升的趋势,但最大酶活却不及保加利亚尖椒,从第 7 天起,活性开始下降,但始终能维持较高的酶活水平(图 3)。

于转 RS-AFP2 辣椒(图 4)。

2.3.3 接种疫霉菌后 PPO 活性变化 保加利亚尖椒接种后到第 3 天,其 PPO 活性持续上升,然后一直到第 7 天都表现出下降的趋势,第 9 天酶活又开始上升;转 RS-AFP2 辣椒的变化曲线同保加利亚尖椒基本相似,但无论在接种前还是接种后,其酶活都明显高于保加利亚尖椒(图 5)。

2.3.4 接种疫霉菌后 PAL 活性变化 在 PAL 活性方面,保加利亚尖椒的变化曲线同 PPO 活性具有相同的变化趋势;而转 RS-AFP2 辣椒与保加利亚尖椒的不同之处在于:其 PAL 酶活在接种病前和接种后都明显高于保加利亚尖椒,另外,在接种后的第 5 天,转 RS-AFP2 辣椒 PAL 酶活不是降低,而是在升高(图 6)。

2.4 电泳分析

2.4.1 SOD 同工酶电泳分析 通过 SOD 同工酶电泳分析发现,无论在接种前还是接种后,转 RS-AFP2 辣椒

和保加利亚尖椒都维持在 3 条带,没有条带数的变化(图 7)。

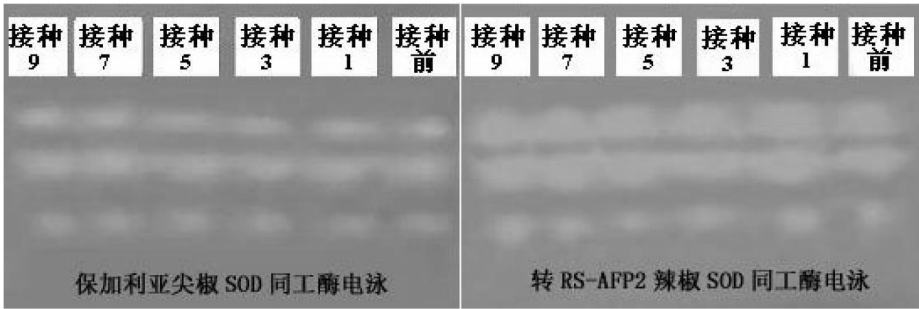


图 7 SOD 同工酶电泳,接种 1~9 表示接种后的第 1~9 天

2.4.2 POD 同工酶电泳分析 接种前,保加利亚尖椒 POD 同工酶电泳条带为 2 条,但接种后,表现出 4 条带,

增加 2 条;转 RS-AFP2 辣椒在接种前为 3 条带,但在接种后的第 3 天,增加 1 条带,也表现出 4 条带(图 8)。

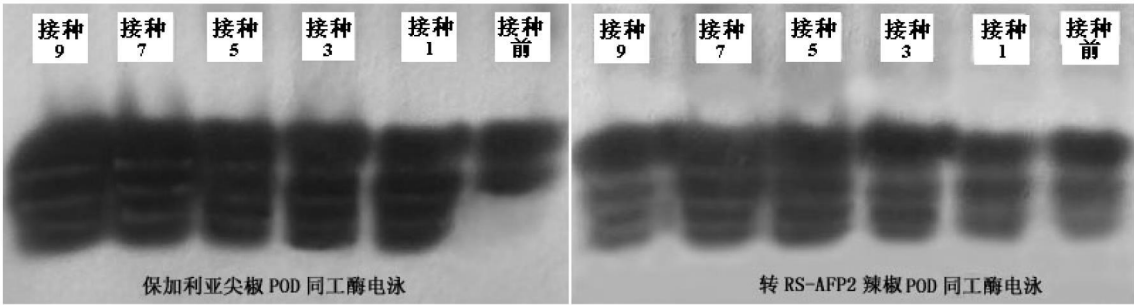


图 8 POD 同工酶电泳,接种 1~9 表示接种后的第 1~9 天

3 讨论

SOD、POD、PPO、PAL 的活性与植物抗病性密切相关。植物体内广泛存在能清除活性氧代谢的保护酶,如 POD、PPO、SOD 等,可以把活性氧转化成低活性物质,从而保护膜系统免受自由基的伤害^[6]; PPO、POD 可将植物体内的酚氧化成醌,致使病原菌中毒死亡^[7];除此以外, PPO、POD、PAL 还能催化木质素合成,木质化了的细胞壁机械性能加强,一方面增加了细胞壁抗病原物的穿透压力,另一方面限制真菌酶和毒素的扩散,对病原菌从寄主获得水和营养物质的路径起到限制作用^[8];另外, PAL 能参与酚类物质的合成,这些酚类物质能直接杀伤病原菌,为植物提供保护; PAL 还能催化苯丙氨酸直接脱氨基转化为反式肉桂酸,是植保素生物合成的关键酶,植保素是参与植物防御反应的重要生理活性物质之一,它们能直接阻止病原物的生长发育和侵染^[9]。研究发现,辣椒在接种疫霉菌后,由于受到病原菌的诱导,都表现出酶活的上升,来增强机体对病原物的抵抗能力,但并非都持续升高,除 POD 为递增曲线外,

其他都表现出不同程度的曲折。许多研究发现,植物在感病后, SOD、PPO、POD、PAL 活性一般都会持续升高^[10-11],但也有研究发现, SOD、PPO、POD、PAL 活性在受到病原物诱导后表现出曲折性变化,而不是持续性升高^[12-13],该研究的结果也反映出这一变化曲线。但无论曲线如何变化,转 RS-AFP2 辣椒各种酶活的平均水平都比保加利亚尖椒高,尤其体现在接种前的很低水平,这在 PAL 和 PPO 上最能得到体现,在接种后第 7 天,保加利亚尖椒表现出疫霉病症状, PAL 和 PPO 活性呈现出最低水平,转 RS-AFP2 辣椒 PAL 和 PPO 活性虽下降,但仍比保加利亚尖椒高,最终也并没有表现出疫霉病症状。植物同工酶条带数与植物病害同样也存在着密切的关系,研究发现,保加利亚尖椒 POD 同工酶接种前为 2 条带,转 RS-AFP2 辣椒接种前为 3 条带,这正好与 POD 活性测定结果一致,说明转 RS-AFP2 辣椒接种前 POD 活性高于保加利亚尖椒是由于增加了新的 POD 同工酶。但从接种后第 3 天起,两者同工酶条数一致,推

测此时 POD 活性的变化是由其中的某一条或几条同工酶活性被诱导所引起的, SOD 活性的变化和同工酶电泳结果也显示出这种情况。病原体感染植物后, 会使植物组织发生特殊的代谢变化, 迅速诱导出许多种新的同工酶, 或提高其中某一种同工酶的活性, 这些新产生的同工酶对酚的代谢、木质素的形成及对激素的影响等产生重要作用, 从而在寄主对病菌的抗性反应中占重要地位^[14]。

参考文献

- [1] 李云祥, 王光英, 万兵全, 等. 日光温室辣椒疫病发生规律及综合防治对策[J]. 植物保护, 2007, 33(4): 124-126.
- [2] Markand S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1974, 47: 469-474.
- [3] 梁军锋, 薛泉宏, 牛小磊, 等. 7 株放线菌在辣椒根部定殖及对辣椒叶片 PAL 与 PPO 活性的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2118-2123.
- [4] 潘建菁, 纪成灿, 刘冬霞. 青枯菌感染后烟株体内过氧化物酶活性的变化及其与抗病性的关系[J]. 中国烟草科学, 2004(3): 28-30.
- [5] 袁庆华, 桂枝. 苜蓿褐斑病抗性 with 几种同工酶的关系[J]. 草业学报, 2003, 12(6): 58-63.
- [6] Francisco A L, Maria A L, Isáas M R et al. Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120(1): 13-20.

- [7] Leila F, Azra R. Studies on the superoxide anion production and peroxidase activity in potato leaf cell suspension exposed to salicylic acid[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2006, 28(3): 237-243.
- [8] Piyada T, Michelle D, John C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility[J]. Planta, 2004, 220(1): 105-117.
- [9] Nathalie W, Dirk D, Rony S. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in roots of banana (*Musa acuminata* AAA, cvs Grande Naine and Yangambi km5) before and after infection with *Radopholus similis*[J]. Nematology, 2006, 8(2): 201-209.
- [10] Jung W J, Jin Y L, Park R D, et al. Treatment of *Paenibacillus illinoisensis* suppresses the activities of antioxidative enzymes in pepper roots caused by *Phytophthora capsici* infection[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22: 901-907.
- [11] Devi M C, Reddy M N. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*[J]. Plant Growth Regulation, 2002, 37: 151-156.
- [12] Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108: 429-441.
- [13] 马海宾, 郑服丛, 康丽华. 辣椒感染疫病后生化指标的响应研究[J]. 生物技术, 2006, 16(3): 35-38.
- [14] 冉莹青, 利容干, 王建波. 辣椒感染疫霉菌后几种酶活性及同工酶谱带变化[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 156.

Study on Several Biochemical Indexes of RS-AFP2 Transgenic Pepper after Infected with *Phytophthora capsici*

HE Wei-hua^{2,1}, LI Yuan^{1,2}, ZENG Fu-hua^{2,1}, CHENG Xin-bo¹, HUANG Zhen-chi^{1,2}

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. School of Life Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China)

Abstract: Used Bulgaria pepper as control, the RS-AFP2 pepper was surveyed on disease infection, the SOD, POD, PPO, PAL, SOD isozyme, POD isozyme were analyzed before and after *Phytophthora capsici* infected, which was to test the disease-resistant effects of RS-AFP2 pepper. Results: ①The SOD activity in Bulgaria pepper increased immediately after infected with *Phytophthora capsici*, but, it started to decline on the third day, when on the seventh day, the plants presented the symptom of the disease. However, the SOD activity in the RS-AFP2 pepper started to increase in the 24 hours after inoculation, on the seventh day, it started to decline, but the plants didn't show the symptom of the disease. ②The POD activity in the RS-AFP2 pepper was significantly higher than Bulgaria pepper before inoculation, but, from the fifth day after inoculation, the Bulgaria pepper was higher than the RS-AFP2 pepper. ③The PPO and PAL activity in the RS-AFP2 pepper was significantly higher than Bulgaria pepper before and after inoculation. ④Before and after inoculation, the RS-AFP2 pepper and the Bulgaria pepper had the same SOD isozyme electrophoresis bands. ⑤The POD isozyme in Bulgaria pepper increased 2 bands after inoculation, which increased 1 bands in the RS-AFP2 pepper, at last, they all had 4 bands.

Key words: *Phytophthora capsici*; SOD; POD; PPO; PAL; Isozyme