

木霉菌 REMI 转化体诱导番茄植株产生防御酶系的研究

刘 限¹, 赵 岩¹, 高增贵², 庄敬华², 郭培磊¹

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110164; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 对不同木霉菌 REMI 转化体诱导番茄产生的 PAL、POD、CAT 和 SOD 防御酶系进行了研究。结果表明: Ttm55 处理番茄植株产生的酶活性与其它菌株有所不同, PAL、POD 和 CAT 的变化趋势明显不同于其它菌株; SOD 与其它菌株的变化趋势一致, 但 SOD 酶活性高于其它菌株。Ttm31 处理番茄植株产生的各种防御酶系的变化趋势与其它菌株的基本一致, 但 CAT、PAL 活性高于其它菌株; 而 SOD、POD 活性稍低。Ttm34 处理番茄植株产生的防御酶系中 POD、PAL 活性稍高; 而其它酶活性稍低。

关键词: 木霉菌转化体; 番茄; 防御酶

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)09-0062-03

木霉菌(*Trichoderma* spp.)作为重要的植物病害生防菌已引起人们的普遍关注, 目前关于木霉菌生防机制的研究大多集中于对病原菌的重寄生作用、拮抗作用和营养竞争方面^[1-4]。De Meyer 等利用哈茨木霉 T39 接种根部或叶子, 控制了灰葡萄孢引起的病害, 认为诱导抗性是重要机制之一^[5]。Yedidia 等也证实了哈茨木霉菌株 T203 穿透到黄瓜根部产生了一种类似的诱导抗

性^[6]。为了研究木霉菌与植物抗病代谢活动的关系, 现利用限制性内切酶介导整合(Restriction Enzyme-Mediation Integration, REMI)技术对木霉菌 T21 进行了改造, 获得了对番茄灰霉病防效不同的木霉菌转化体, 利用这些木霉菌转化体处理番茄幼苗后, 对叶片几种主要防御酶活性进行了初步研究, 为进一步深入研究木霉菌的多重生防机理和 REMI 技术在木霉菌上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 番茄品种和供试菌株

品种为 L1402, 菌株为木霉菌初发菌株 T21, REMI 变异株 Ttm31、Ttm34 和 Ttm55。

1.2 接种及取样

将番茄 L1402 育苗后, 移栽到花盆中, 于沈阳农业大学植物免疫研究所温室, 待长至 5~6 叶期, 采用毛笔

第一作者简介: 刘限(1970-), 男, 河北唐山人, 博士, 副教授, 现主要从事设施蔬菜病害生物防治研究工作。E-mail: benz117309@sina.com.cn。

基金项目: 辽宁省博士启动资助项目(20051051); 辽宁省教育厅资助项目(20040323)。

收稿日期: 2009-03-20

Study of Vegetative Storage Protein in *Melia azedarach* L.

MENG Chun-xiao, GAO Zheng-quan

(College of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049, China)

Abstract: Vegetative storage proteins(VSPs)in the *Melia azedarach* L. were identified by using optical microscopy and SDS-PAGE. Under optical microscope, deep blue masses in a granular appearance were observed in the secondary xylem parenchyma cells of the dormancy season barks after stained with mercury-bromophenol blue. However, there was no granular protein in the development season barks. Compared with SDS-PAGE results of the development season barks, there were six 12, 30, 32, 38, 40, 53 kD major proteins expressed in the dormancy season barks, which was probably the vegetative storage protein of *Melia azedarach* L.

Key words: *Melia azedarach* L.; Vegetative storage proteins; Microscopy; SDS-PAGE

蘸木霉菌孢悬液(1×10^7 个孢子/mL)刷番茄植株下部1~3叶片,接种量为每株孢悬液1 mL。然后将接菌的番茄植株移至25℃的人工气候室中生长,同时在24 h内保持人工气候室的湿度在90%以上,以后每天喷水早、晚1次。接种木霉菌后的12、24、48、72、96 h后取植株4~6片叶,用蒸馏水冲洗干净并用滤纸吸干水分,每处理准确称取1 g, -20℃低温冰箱中保存。

1.3 防御酶系测定

1.3.1 酶粗提取液的制备 将1 g样品,放入预冷的研钵中,加入1.5 mL 硼酸缓冲液及0.2 g 石英砂,冰浴中研磨成匀浆,再用1.5 mL 缓冲液中洗研钵及钵棒2次,合并入离心管,15 000 rpm, 4℃离心20 min,上清液为酶的粗提液。 -20℃低温保存。

1.3.2 防御酶系测定 苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参见 Jean-Berchmans 等方法^[6-8]。

2 结果与分析

2.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)

由图1可以看出,不同木霉菌 REMI 转化体接种番茄植株下部叶片后,12~96 h 番茄植株上部叶片中 PAL 的活性变化趋势基本一致,都在24 h 出现酶活高峰,之后酶活性逐渐下降。Ttrm55 与其他的菌株稍有不同,在72 h 酶活性又有所上升,出现了2个酶活高峰。在酶活高峰处,Ttmm31和 Ttmm34 处理,番茄叶片中的 PAL 活性高于初发菌株 T21 处理,而 Ttmm55 处理 PAL 活性低于初发菌株 T21 处理。

2.2 过氧化物酶(POD)

由图2可以看出,除了 Ttmm34 外,其余菌株处理后,番茄叶片中 POD 活性变化趋势基本一致,随着接种时间的延长酶活性逐渐增高,但酶活稍有不同。Ttmm34 在48 h 时出现酶活高峰,之后逐渐下降;Ttmm55 诱导番茄植株在48 h 时出现酶活低峰,然后又开始上升;Ttmm31 使酶活性随时间变化呈波浪式变化,24 h 时酶活处于最低点,之后上升,在72 h 时酶活又出现低峰,然后再上升;初发菌株 T21 随着时间变化逐渐升高的。说明不同的菌株处理后,对番茄叶片中 POD 活性的影响不同。

2.3 过氧化氢酶(CAT)

由图3可以看出,不同菌株处理后,番茄植株 CAT 活性的变化不同,除 Ttmm55 外,其余菌株处理番茄叶片中 CAT 活性都随时间的延长而下降,Ttmm31 和 Ttmm34 下降趋势较快。72 h 以前,Ttmm55 处理番茄叶片中 CAT 活性变化规律相反,Ttmm55 在24 h 时出现一个酶活高峰;72 h 后诱导产生的 CAT 活性开始上升。菌株 T21 处理番茄叶片 CAT 活性基本不变,活性低于所有木霉菌转化体。

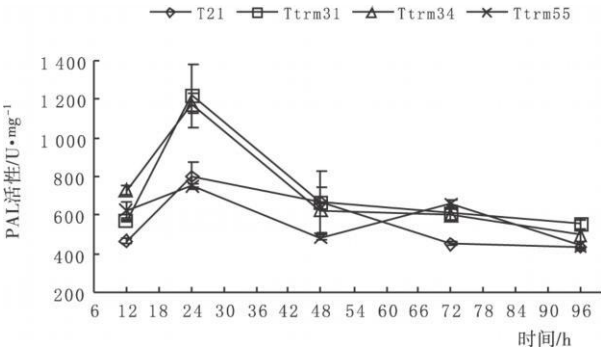


图1 木霉菌转化体处理后番茄叶片 PAL 活性的变化

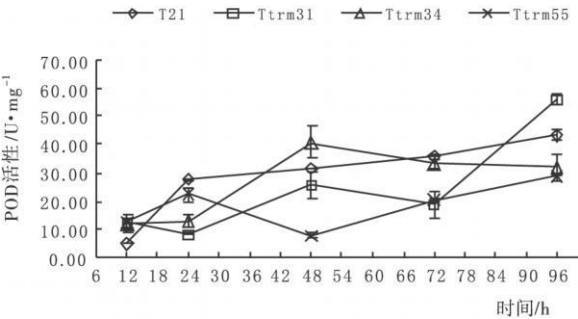


图2 木霉菌转化体处理后番茄叶片中 POD 活性的变化

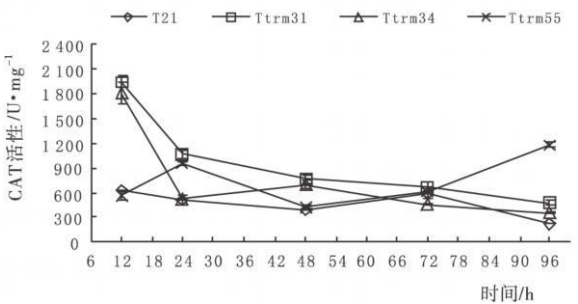


图3 木霉菌转化体处理后番茄叶片 CAT 活性的变化

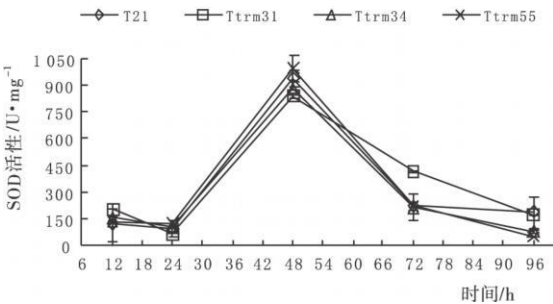


图4 木霉菌转化体处理后番茄叶片中 SOD 活性的变化

2.4 超氧化物歧化酶(SOD)

由图4可知,所有木霉菌菌株处理番茄后,叶片中 SOD 活性随时间变化的趋势一致,酶活性都在48 h 时

出现最高峰。其中 Ttrm55 和 T21 处理番茄叶片中的酶活性高于 Ttrm31 和 Ttrm34。

3 讨论

3.1 木霉菌转化体处理后番茄叶片防御酶系变化不同

PAL 和 POD 是植物防御反应的重要酶系已成为植物抗病性评价的重要生理指标。PAL 是木质素和异黄酮类植保素合成的关键酶 POD 参与木质素和植保素的合成并清除体内活性氧。李洪连等(1993)报道, 黄瓜在进行诱导接种后, POD、PAL 活性明显增强, 木质素和酚物质类含量明显增多^[9]。该研究发现, 与接种初发菌株相比, 一些转化体接种后可诱导番茄植株 POD 和 PAL 活性及防病效果明显提高, 与前人研究结果一致。然而该研究发现, Ttrm55 虽较上述 3 种酶活性低, 但防效仍较高, 说明可能有其它防御酶系或机制参与了该转化体对番茄的抗性诱导。

3.2 木霉菌染色体的外源质粒片段插入变异的多重性 导致与宿主互作反应的多样性

Yakoby(2002)研究通过 REMI 技术获得的 *Colletotrichum gloeosporioides* 的 2 个没有致病性的突变体: Cg-M-142 和 Cg-M-1150 对鳄梨果实炭疽病的生防机理时发现, 菌株 Cg-M-142 是通过提高 HI-ATPase 活性和诱导产生活性氧(ROS)等早期信号, 随后提高 PAL 活性、表儿茶酸和抗菌物质的浓度, 从而使果实腐烂延后, 而菌株 Cg-M-1150 则不能激活早期信号来达到防病的作用^[10]。该试验也发现了转化体间诱导番茄产生防御酶的种类及活性明显不同, 可能与不同转化体变异的遗传基础差异不同有关, 导致了与番茄互作反应的差异。因此今后对不同插入位点分子特性的深入研究, 明确插入位点的侧翼序列, 对今后研究生防木霉菌与宿主互作

类型及分子基础以及发现新的生防机理均具有重要意义, 同时对其它有益微生物与宿主的互作的基础研究提供了新思路。

参考文献

- [1] Woo S L, Lorito M. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol[M] // Vurro M, J. E. (Eds.). Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, 2007: 107-130.
- [2] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. *Nature Review Microbiology*, 2004 (2): 43-56.
- [3] Vinale F, Marra R, Scala F, et al. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006 43: 143-148.
- [4] Benitez T, Rincón A M, Lim N M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains[J]. *International Microbiology*, 2004(7): 249-260.
- [5] De Meyer G, Bigirimana I J, Elad Y, et al. Induced systemic resistance in *trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *botrytis cinerea*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, 104(3): 279-286.
- [6] Yedidia I, Benhamou N, Chet I. Induction of defence responses in cucumber plants(*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999 65(3): 1061-1070.
- [7] Jean-Berchmans N, 徐同, 宋风鸣, 等. 哈茨木霉 NF9 菌株对水稻的诱导抗病性[J]. *中国生物防治*, 2003 19(3): 111-114.
- [8] 薛春生, 肖淑芹, 王国英, 等. 玉米与矮花叶病毒互作对防御反应酶系活性的影响[J]. *种子*, 2005 24(3): 6-10.
- [9] 李洪连, 王守正, 王金生, 等. 黄瓜对炭疽病诱导抗性的初步研究II. 诱导抗病机制的研究[J]. *植物病理学报*, 1993 23(4): 327-332.
- [10] Yakoby N, Benp-Moualem D, Kohler I et al. The analysis of fruit protection mechanisms provided by reduced-pathogenicity mutants of *colletotrichum gloeosporioides* obtained by restriction enzyme mediated integration[J]. *Phytopathology*, 2002 92(11): 1196-1202.

Study of Defensive Enzyme in Tomato Induced by *Trichoderma* REMI Transformants

LIU Xian¹, ZHAO Yan¹, GAO Zeng-gui², ZHUANG Jing-hua², GUO Pei-lei¹

(1. College of Bio-science and Technology of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China; 2. College of Plant Protection of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: A series of defensive enzyme, PAL, POD, CAT and SOD in tomato plant induced by *Trichoderma* REMI transformants were studied. The results showed that the activities of PAL, POD and CAT in tomato induced by Ttrm55 were great different from other transformants except SOD. SOD activity in tomato stimulated by strain Ttrm55 was higher than that induced by others. The CAT, PAL activities induced by Ttrm31 were higher than those by other transformants, but lower in SOD and POD than those by others. POD and PAL activities were higher in tomato induced by Ttrm34 than other enzymes, but contrary in other enzymes.

Key words: *Trichoderma* REMI transformants; Tomato; Defense enzyme