

青枯菌诱导广藿香防御相关酶同工酶分析

柴婷婷, 贺红*, 谢建辉, 徐燃, 杨玉秀

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究青枯菌诱导广藿香的致病过程及防御相关酶同工酶的动态变化。方法 利用青枯菌粗毒素诱导广藿香试管苗, 并用聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 对诱导植株中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)同工酶谱带的变化进行分析。结果 青枯菌诱导 1~7 d 后的广藿香植株, 表现渐进的发病过程, 开始时, 植株失绿、少数叶片萎垂; 逐渐植株茎秆弯曲、整株叶片萎蔫。同工酶电泳分析表明, SOD 同工酶在第 1、3 天时分别出现了新谱带, 与对照共有的谱带, 强度先增后减; CAT 同工酶在第 3、5 天时分别出现新谱带, 第 6 天时强度达到最大; POD 同工酶在第 1、4 天时分别出现了新谱带, 强度先增后减, 第 7 天时所有谱带消失。结论 青枯病的发生呈现渐进的过程。青枯菌诱导 1~7 d, 广藿香 SOD、CAT 和 POD 同工酶谱带在数目和强度上均有所不同, 呈动态变化, 表明 SOD、CAT 和 POD 在广藿香抵抗青枯菌入侵时可能起到较为重要的作用。

关键词: 广藿香; 青枯菌; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 过氧化物酶

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1170-04

Analysis on defense-related enzyme isozymes in *Pogostemon cablin* induced by *Ralstonia solanacearum*

CHAI Ting-ting, HE Hong, XIE Jian-hui, XU Ran, YANG Yu-xiu

College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To investigate the pathogenesis process and the dynamic change of defense-related enzyme isozymes in *Pogostemon cablin* induced by *Ralstonia solanacearum*. **Methods** The crude toxin from *R. solanacearum* was used to induce the test-tube plantlets of *P. cablin* and polyacrylamide gel electrophoresis was used to analyze the isozyme bands changes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POD) in induced plants. **Results** *P. cablin* represented progressive pathogenesis during the *R. solanacearum* induction. Initially, the plants became gray-green and a few leaves wilted. Along with the disease developing, the stems of the plants were bending down and the whole plants wilted. The isozyme electrophoresis showed that new SOD bands emerged on the days 1 and 3, respectively, the strength of common bands of both the control and induced plants increased at first and then decreased. New CAT bands emerged on days 3 and 5, respectively, and achieved maximum strength on day 6. And new POD bands emerged on days 1 and 4, respectively, and the strength of the bands increased at first and then decreased, and all the bands disappeared on day 7. **Conclusion** The occurrence of bacterial wilt shows a gradual process. SOD, CAT, and POD isozymes represent dynamic change in *P. cablin* induced by *R. solanacearum* from 1—7 d, and the differences occur in the numbers and the strength of the bands, indicating that these enzymes might play an important role in *P. cablin* defense against *R. solanacearum*.

Key words: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; *Ralstonia solanacearum*; superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT); peroxidase (POD)

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 以干燥地上部位入药, 是临床上常用的芳香化湿药^[1]。广藿香生产上面临青枯病的危害, 该病是由青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 引

起的毁灭性土传病害^[2], 发病植株茎叶萎蔫, 逐渐全株枯死, 且迅速蔓延。选育抗病品种是降低病害损失的重要途径, 而加快寻找和筛选抗性的种质材料, 减少表型选择可能导致的误差, 是首先要解决

收稿日期: 2011-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873376)

作者简介: 柴婷婷 (1987—), 女, 新疆石河子人, 在读硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。Tel: (020)39358544 E-mail: binglingctt@163.com

*通讯作者 贺红 Tel: (020)39358067 E-mail: hehong67@yahoo.com.cn

的问题。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 是植物体内重要的防御酶, 参与活性氧清除及酚类、木质素和植保素等抗病相关物质的合成, 能抵御活性氧及氧自由基对细胞膜系统的伤害, 增强植物对病害的抵抗能力^[3]。植物受到病原菌侵染时, 这些防御相关酶同工酶会产生相应的变化, 且在一定程度上反映了寄主植物的抗性水平^[3]。然而, 关于广藿香这方面的研究尚未见报道。本实验主要研究青枯菌诱导广藿香的致病过程及其 SOD、CAT、POD 同工酶的动态变化, 以揭示病原物与寄主之间的互作关系, 为广藿香抗病育种及抗病机制的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 菌株 HX5, 由本实验室采用组织分离法从感染了青枯病的广藿香植株中分离获得^[4]。

1.1.2 供试植株 广藿香植株采自广州中医药大学药圃, 经广州中医药大学药用植物教研室潘超美教授鉴定为唇形科广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.。采取广藿香叶片培育试管苗, 选择株高 10 cm 左右的试管苗用作对照药材 (CK)。

1.2 方法

1.2.1 青枯菌的培养 将供试菌株 HX5 划线接种于 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 培养基上, 培养 48 h。TTC 培养基配方: 蛋白胨 10.0 g, 酸水解酪蛋白 1.0 g, TTC 0.05 g, 葡萄糖 10.0 g, H₂O 1 000 mL^[4]。

1.2.2 青枯菌粗毒素的制备 取 TTC 培养基上培养的青枯菌单菌落, 接种至 Nutrient Agar (NA) 液体培养基中, 于 30 °C、200 r/min 恒温振荡培养 12 h 后, 测量细菌培养液的吸光度 (*A*) 值, 并将其于 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得粗毒素原液^[5]。

1.2.3 青枯菌诱导广藿香试管苗 将青枯菌粗毒素按一定比例加入 Murashige and Tucker (MT) 培养基中, 使其终浓度为 5.0×10^8 cfu/mL, 再将广藿香试管苗伤根处理后接入添加了粗毒素的培养基中, 进行致病性诱导试验。

1.2.4 酶液提取 分别称取经青枯菌诱导 1~7 d 的广藿香植株及未经诱导的对照植株叶片 0.5 g, 加入 1.0 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 冰浴研磨。在 4 °C 下, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为酶液, 置于 -20 °C 冰柜中保存, 供同工酶电

泳检测^[6]。

1.2.5 电泳 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 3 种同工酶分析所用的分离胶质量分数均为 7.5%, 浓缩胶质量分数均为 3%。每个点样孔上样 30 μL, 用 0.1% 溴酚蓝作为前沿指示剂, Tris-甘氨酸 (pH 8.3) 作为电极缓冲液, 置于 4 °C 冰箱中进行电泳, 初始电压 100 V, 2 h 后 200 V, 待指示剂距玻璃板末端 1.5 cm 处时, 停止电泳。在此电泳条件下, 每种同工酶进行 4 次重复试验, 均出现稳定的条带模式。

1.2.6 染色 SOD 染色采用氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 法^[7]。在 0.24 mmol/L NBT 溶液黑暗浸泡 20 min, 然后在 pH 7.8 的 0.036 mol/L 磷酸缓冲液 (内含 0.028 mol/L 四甲基乙二胺, 2.5 mmol/L 核黄素) 中黑暗浸泡 20 min, 最后在 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (内含 0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸) 中光照 20 min, 在紫色背景下出现黄色条带。

CAT 染色采用铁氰化钾法^[8]。用预冷蒸馏水冲洗胶板后, 加入适量 0.3% 过氧化氢溶液, 轻轻振荡凝胶板 10 min, 倒出溶液, 再用预冷蒸馏水冲洗, 然后加入含 2% 三氯化铁-2% 铁氰化钾 (1:7) 的溶液, 10 min 后在墨绿色背景下出现亮黄色条带。

POD 染色采用醋酸-联苯胺法^[9]。称取 0.1 g 联苯胺, 用 1 mL 的冰醋酸充分溶解, 依次加入 5% 乙二胺四乙酸二钠 5 mL, 5% 氯化铵 5 mL, 蒸馏水 160 mL, 用前加入 0.3% 过氧化氢 5 mL, 30 °C 恒温下出现深蓝色条带。

2 结果与分析

2.1 青枯菌诱导广藿香试管苗的致病过程

将广藿香试管苗伤根处理后接入添加了青枯菌粗毒素的培养基中, 进行致病性诱导试验。经过反复试验, 以终浓度为 5.0×10^8 cfu/mL 的青枯菌粗毒素较为适宜, 诱导的广藿香试管苗呈现渐进的发病过程。从图 1 可以看到, 未添加粗毒素的对照植株生长正常, 植株保持直立、叶片舒展、色泽深绿。而在添加粗毒素的处理中, 植株生长 2 d 后顶部叶片开始收缩下垂, 色泽稍变浅; 生长 4 d 后更多叶片失水萎垂, 植株整体倾斜; 7 d 后植株茎秆弯曲, 萎蔫发黄, 最后凋零死亡, 这与田间感染青枯病的发病状况较为一致。

2.2 青枯菌诱导后广藿香防御相关酶同工酶分析

在建立的青枯菌诱导广藿香致病模式的基础上, 分别取经青枯菌诱导 1~7 d 的广藿香植株及未经诱导的对照植株叶片, 提取酶液, 并采用聚

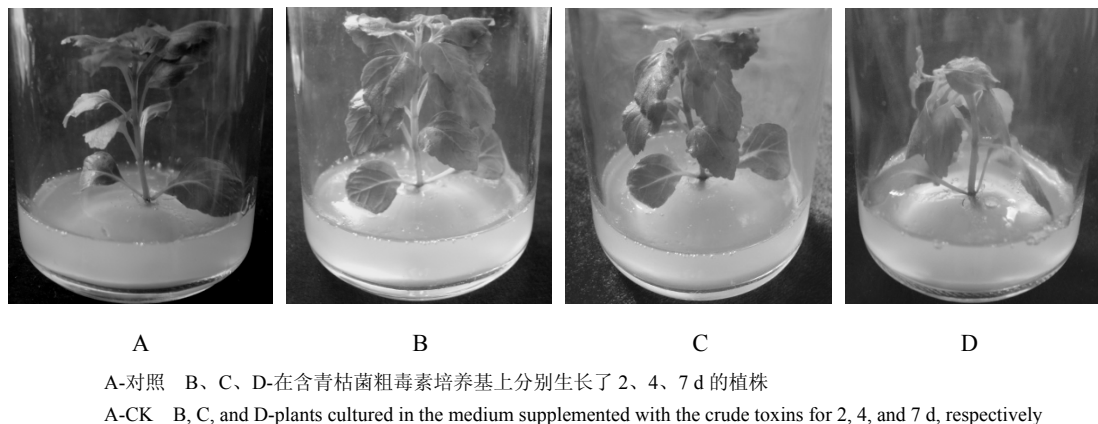


图 1 青枯菌诱导的广藿香试管苗

Fig. 1 Test-tube plantlets of *P. cablin* induced by *R. solanacearum*

聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法对 SOD、CAT、POD 同工酶进行分析,以观察其同工酶谱带的变化情况。

2.2.1 SOD 同工酶分析 图 2-A 显示诱导后 1~7 d 的 SOD 同工酶谱带的变化情况。对照主要有迁移率为 0.28、0.33 和 0.50 的 3 条谱带,诱导后的植株,出现与对照共有的 3 条谱带,谱带色度和宽度均呈先增后减的趋势,且在第 3 天时达到高峰。此外,第 1、3 天分别出现 1 条新的谱带,迁移率分别为 0.45、0.37,并一直持续至第 7 天。

2.2.2 CAT 同工酶分析 图 2-B 显示诱导后 1~7 d 的 CAT 同工酶谱带的变化情况。对照主要有迁移率为 0.17、0.25 的 2 条谱带,诱导后的植株,与对照共有的 2 条谱带变化较为复杂,从色度和宽度上看,呈现两次先增后减,分别在第 2 天和第 4 天时达到高峰。此外,第 3、5 天时分别出现迁移率为 0.47、0.58 的新谱带,并一直持续至第 7 天,且在第 6 天时强度达到最大。

2.2.3 POD 同工酶分析 图 2-C 显示诱导后 1~7 d 的 POD 同工酶谱带的变化情况。对照出现迁移率为 0.07、0.63 的 2 条谱带。诱导 1 d 后的植株出现了 1 条迁移率为 0.56 的新谱带,第 3 天时强度有所增加,随后逐渐减弱,并持续至第 6 天;诱导 4 d 后又出现了 1 条新谱带,迁移率为 0.39;第 7 天时所有谱带消失。

3 讨论

青枯菌是一种毁灭性的土传性病原菌,寄主范围广泛。该病原菌从寄主的根部,入侵木质部导管,通过维管束系统迅速扩张到植物的地上部分。有关青枯菌的致病机制,植物病害生理学研究表

明,青枯菌在导管中生长时可产生大量的胞外多糖,从而影响和阻碍植物体内的水分运输引起植株枯萎^[10];同时,青枯菌还可向细胞外分泌多种

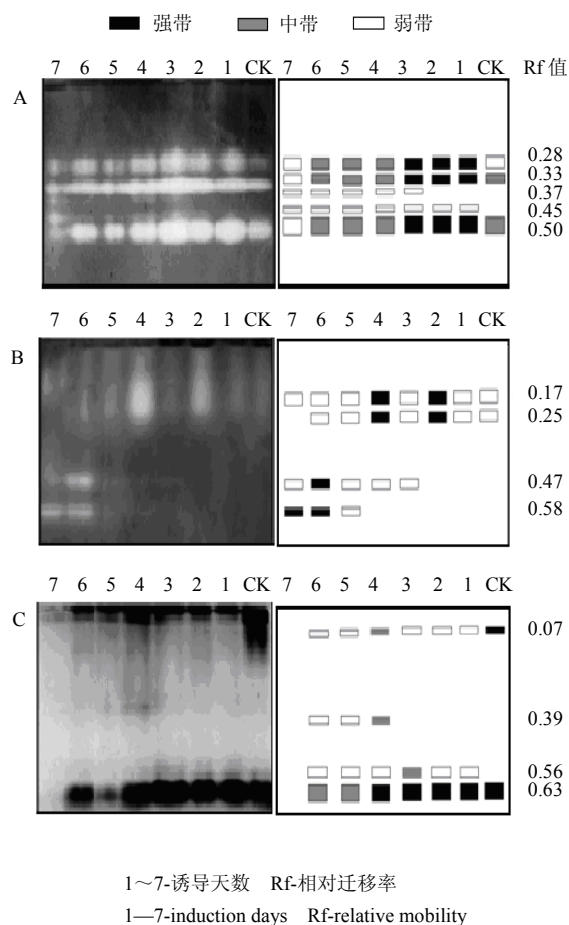


图 2 SOD (A)、CAT (B)、POD (C) 同工酶电泳图 (左) 及其模式图 (右)

Fig. 2 SOD (A), CAT (B), and POD (C) isozymes electrophoresis (left) and their diagram (right)

细胞壁降解酶（如果胶酶类和纤维素酶类），这些细胞壁降解酶对破坏导管组织也起一定作用。青枯菌培养后，经滤过获得的粗毒素含有大量的胞外分泌物是常用的重要致病因子之一^[11]。本研究以青枯菌制备的粗毒素进行诱导试验，考察广藿香体内防御相关酶同工酶的变化，以揭示广藿香的抗性生理反应。

近年来研究表明，SOD、CAT、POD 在植物抗病过程中起着重要作用。任爱霞等^[12]研究表明 4 条 POD 同工酶酶带与棉花抗黄萎病有关，这些酶带的特殊表现可用于棉花抗病性辅助育种。袁庆华等^[13]在苜蓿上的研究指出，大部分抗病株系的 POD 和 SOD 同工酶有新谱带出现，提示可能用作鉴定苜蓿抗病的同工酶标记。朱友林等^[14]研究表明 Rf 值为 0.25 的 SOD 同工酶酶带，与玉米抗病基因的作用有关。本研究建立了在实验室条件下青枯菌诱导广藿香致病的模式，考察了青枯菌诱导 7 d 内 SOD、CAT 和 POD 同工酶谱的动态变化，与对照相比，均有新增谱带出现，同时在强度上也有所增减，表明 SOD、CAT 和 POD 在广藿香抵抗青枯菌入侵时可能起到较为重要的作用，为后续种质材料的抗性鉴定及抗病育种提供依据，但 SOD、CAT 和 POD 同工酶的变化规律及其与广藿香抗性的关系仍有待深入研究。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部 2010.

[2] 文衍堂. 海南广藿香、沙姜青枯病病原菌的鉴定 [J].

热带作物学报, 1984, 5(2): 113-119.

- [3] 张树生, 胡 蕾, 刘忠良, 等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系 [J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48-49.
- [4] 刘 丹, 贺 红, 黄海波, 等. 广藿香青枯病菌的分离培养及致病性测定 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1596-1599.
- [5] 敖世恩, 杨 媚, 周而勋, 等. 水稻抗纹枯病突变体的离体筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(1): 47-50.
- [6] 路 丹, 贺礼学, 刘 妮, 等. 九种绢蒿属植物过氧化物酶同工酶分析 [J]. 生物技术通报, 2008(3): 139-142.
- [7] 邓家彬, 苟 琳, 丁春邦, 等. 姜黄属药用植物的 3 种同工酶分析 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 346-352.
- [8] 王长义, 郭世荣, 刘超杰. 钙对根际低氧胁迫下黄瓜幼苗根系保护酶同工酶表达的影响 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(9): 1874-1880.
- [9] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属种质资源发芽种子过氧化物酶同工酶研究 [J]. 广西植物, 2008, 28(4): 553-557.
- [10] van Alfen N K. Reassessment of plant wilt toxins [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1989, 27: 533-550.
- [11] Toyoda H, Shinizu K, Chatani K, *et al.* Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8(6): 317-320.
- [12] 任爱霞, 胡家恕, 祝水金, 等. 棉花黄萎病抗性过氧化物酶同工酶分析 [J]. 棉花学报, 2002, 14(5): 273-276.
- [13] 袁庆华, 桂 枝. 苜蓿褐斑病抗性几种同工酶的关系 [J]. 草业学报, 2003, 12(6): 58-63.
- [14] 朱友林, 刘纪麟. 受玉米大斑病菌侵染后玉米抗感近等基因系 SOD 动态变化的研究 [J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 133-137.