

# 菜豆（油豆角）苗期抗炭疽病防御酶活性及 HRGP 含量表达分析

曾棱男 肖子恒 李成雁 张 婷 胡国富\*

（东北农业大学生命科学学院，黑龙江哈尔滨 150030）

**摘 要：**以感病菜豆（油豆角）品种老来少和高抗品种大油豆为试材，在菜豆炭疽病菌侵染不同时间（0、3、6、9、12 d）内测定两者叶片中 5 种防御酶（几丁质酶、 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶、SOD、POD 和 LOX）活性及富含羟脯氨酸糖蛋白（HRGP）含量并进行比较。结果表明：接种后抗病品种的防御酶活性和 HRGP 含量均有不同程度的变化，酶活性提高幅度较大的时期因酶种类而异，但都早于感病品种；感病品种防御酶活性升高较慢且较抗病品种滞后。与感病品种相比，抗病品种 POD 活性变化幅度最大，而 HRGP 含量变化幅度最小。 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性测定结果表明，抗病品种接种前酶活性高于感病品种，接种后感病和抗病品种酶活性变化趋势相同。

**关键词：**炭疽病；菜豆；防御酶；酶活性；HRGP 含量

中图分类号：S643.1 文献标识码：A 文章编号：1000-6346（2012）12-0047-05

## Analysis on Expression of Anthracnose Defense Enzyme Activity and HRGP Content in *Phaseolus vulgaris* L. at Seedling Stage

ZENG Ling-nan, XIAO Zi-heng, LI Cheng-yan, ZHANG Ting, HU Guo-fu\*

（Life Science College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China）

**Abstract:** The susceptible bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *chinensis* Hort.) cultivar ‘Laolaishao’ and resistant cultivar ‘Dayoudou’ were taken as testing materials. The activities of 5 kinds defense enzymes (chitinase,  $\beta$ -1, 3-glucanase, SOD, POD and LOX) and HRGP content were detected and analyzed after the 2 cultivars infected by Anthracnose in different times (0, 3, 6, 9, 12 d). The results showed that content of HRGP and the enzyme activities of chitinase, SOD, POD and LOX in resistant cultivar markedly increased with the increase of time course of infection and the disease expansion. The peak of their activities appeared earlier than in susceptible one. Compared with the susceptible cultivars, the activity of POD in resistant cultivar changed most significantly, while the content of HRGP changed with minimum amplitude. And the results of testing enzyme activity of  $\beta$ -1, 3-glucanase showed that the enzyme activity of resistant cultivar in 0 d was higher than susceptible cultivar, while after inoculation its enzyme activity of resistant cultivar change tendency was the same as the susceptible cultivar.

**Key words:** Anthracnose; Bean; Defense enzyme; Enzyme activity; HRGP content

收稿日期：2011-12-16；接受日期：2012-02-28

基金项目：黑龙江省博士后基金项目（LRB07-3）

作者简介：曾棱男，硕士研究生，主要从事植物发育学与植物分子生物学方面的研究，E-mail: lllfairy@sina.com

\* 通讯作者（Corresponding author）：胡国富，教授，主要从事植物发育学与植物分子生物学方面的研究，E-mail: Guofuh2003@yahoo.com.cn

油豆角 (*Phaseolus vulgaris* L. var. *chinensis* Hort.) 是东北地区菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 特有的软荚变种群 (胡国富 等, 2010), 主要分布在黑龙江、吉林、内蒙古东北部等气候冷凉地区 (修殿权 等, 2009)。油豆角主要是以食荚为主, 烹煮后豆荚软面, 纤维少, 豆香味浓, 蛋白质含量较高, 可达其干质量的 20% 以上 (詹云 等, 2006)。油豆角含有人体所需的 18 种氨基酸, 其中必需氨基酸, 特别是赖氨酸含量较高。油豆角在黑龙江省种植面积广, 且种植面积有逐年升高的趋势。然而菜豆炭疽病引起的叶部病害, 严重影响油豆角的质量和产量。在植物的抗病反应过程中, 植物在形态和生理生化上会发生许多改变, 形态的变化包括周皮形成、侵填体及乳突的形成, 细胞壁修饰 (胼胝质、木质素和酚类化合物在壁上沉积)、富含羟脯氨酸糖蛋白 (HRGP) 和富含甘氨酸糖蛋白 (GPR) 的积累; 生理生化的变化包括植物保卫素、蛋白酶抑制剂、病程相关酶 [如抑制病原物生长的过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD)、脂氧化酶]、能攻击病原物的水解酶 [几丁质酶 (CHT) 和葡聚糖酶] 的产生等 (Davis et al., 1993; 王钧, 1995)。此外, 还有与植保素合成有关的酶, 如苯丙氨酸裂解酶 (PAL)、查尔酮合成酶 (CHS)、脂氧合酶 (LOX) 等的变化。本试验以油豆角感病、抗病品种为材料, 在炭疽病菌侵染后的不同时期, 对不同抗性油豆角品种 5 种防御酶活性和 HRGP 含量变化进行了研究, 为了解油豆角抗炭疽病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试油豆角品种为老来少 (感病)、大油豆 (抗病), 均由东北农业大学园艺学院提供; 供试炭疽病菌由东北农业大学生命科学学院胡国富老师提供。

### 1.2 方法

试验于 2010 年 5~7 月在东北农业大学生命科学学院植物实验室进行。将供试品种种子经 5% 次氯酸钠溶液消毒 10 min 后, 用无菌水冲洗, 播于装有灭菌土培养钵中, 放置在 20~25 °C 光照培养箱内育苗, 光照强度 2 000 lx, 光照 16 h, 黑暗处理 8 h, 湿度为 70%。当油豆角第 1 对真叶完全展开时, 用炭疽病菌配制的浓度为  $5 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的孢子悬浮液逐株喷雾接种真叶的正反两面。抗性鉴定时, 每个品种播种 12 钵, 分成 3 组进行培养, 接种后 7 d 进行调查。酶活性和 HRGP 含量检测时, 每个品种播种 30 株, 分成 5 组。分别在接种后 0、3、6、9、12 d 取样, 在液氮中速冻 30 min 后, 保存在 -80 °C 冰箱中备用。

参照《粮食作物种质资源抗病虫鉴定方法》(吴全安, 1991), 接种菜豆炭疽病病菌 7 d 后调查单株发病等级, 以《普通菜豆种质资源描述规范和数据标准》(王述民 等, 2006) 为标准, 进行抗性水平评价。LOX 活性的测定参照 Axelrod 等 (1980) 的方法; POD 活性的测定采用高明波等 (1999) 的方法; SOD 活性的测定参照罗广华和王爱国 (1999) 的方法; HRGP 含量的测定参照蔡武城和袁积厚 (1982) 的方法; CHT 活性的测定参照 Boller 和 Gehri (1983) 的方法;  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性的测定参照史益敏 (1999) 的方法, 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 苗期抗性鉴定

苗期人工接种抗病性鉴定结果表明: 老来少炭疽病病情指数较高, 为 61.5, 属于感病品种; 而大油豆炭疽病病情指数为 0, 属于高抗类型, 二者在苗期有明显不同的抗性表现。

### 2.2 接种炭疽病病菌后油豆角酶活性及 HRGP 含量变化

试验结果表明 (图 1-a), 接种炭疽病病菌后油豆角感病、抗病品种几丁质酶活性均在 6 d 后

呈上升趋势, 且大油豆接种后几丁质酶活性呈现先下降后上升, 9 d 时达到最大值, 而 12 d 又急剧下降到 0 d 时的水平, 而老来少的几丁质酶活性在 12 d 达最大值。初始几丁质酶活性大油豆高于老来少, 并且在 9 d 时大油豆有酶活性的跃升, 这两点可能与大油豆抗炭疽病有关联。

大油豆和老来少接种后  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性变化趋势相似(图 1-b), 均为下降—上升—下降, 在 6~9 d 之间有跃升并达到最大值, 所不同的是初期酶活性抗病品种大于感病品种。

大油豆与老来少两个品种的 HRGP 含量均有一定程度的提高(图 1-c)。抗病品种大油豆在 3~9 d 呈上升趋势, 在 9 d 时达到最大值, 12 d 时接近 0 d 水平。感病品种老来少接菌后 HRGP 含量持续缓慢上升, 12 d 时达到最大值, 但总体来说变化不大。

大油豆接种炭疽病病菌后 3 d 内 SOD 活性一直下降(图 1-d), 6 d 时突然升高达到最大值且高于对照, 但在 12 d 时又急剧下降且低于对照。而老来少的 SOD 活性在 3~9 d 呈上升趋势, 且在 9 d 时达到峰值, 12 d 时有所下降。

两种油豆角在接种炭疽病病菌后 POD 活性都发生了变化(图 1-e), 大油豆 POD 活性比老来少变化幅度要大; 大油豆 POD 活性的高峰期要早于老来少, 在 6 d 时跃升至最大值, 之后呈下降趋势, 而老来少 POD 活性则呈逐渐上升的趋势。

试验结果表明(图 1-f), 接种后两个品种 LOX 活性均为先升后降低, 但抗病品种大油豆接种后 3 d 内 LOX 活性显著升高, 达到最大值, 6 d 时酶性活急剧下降并低于 0 d 水平, 此后慢慢

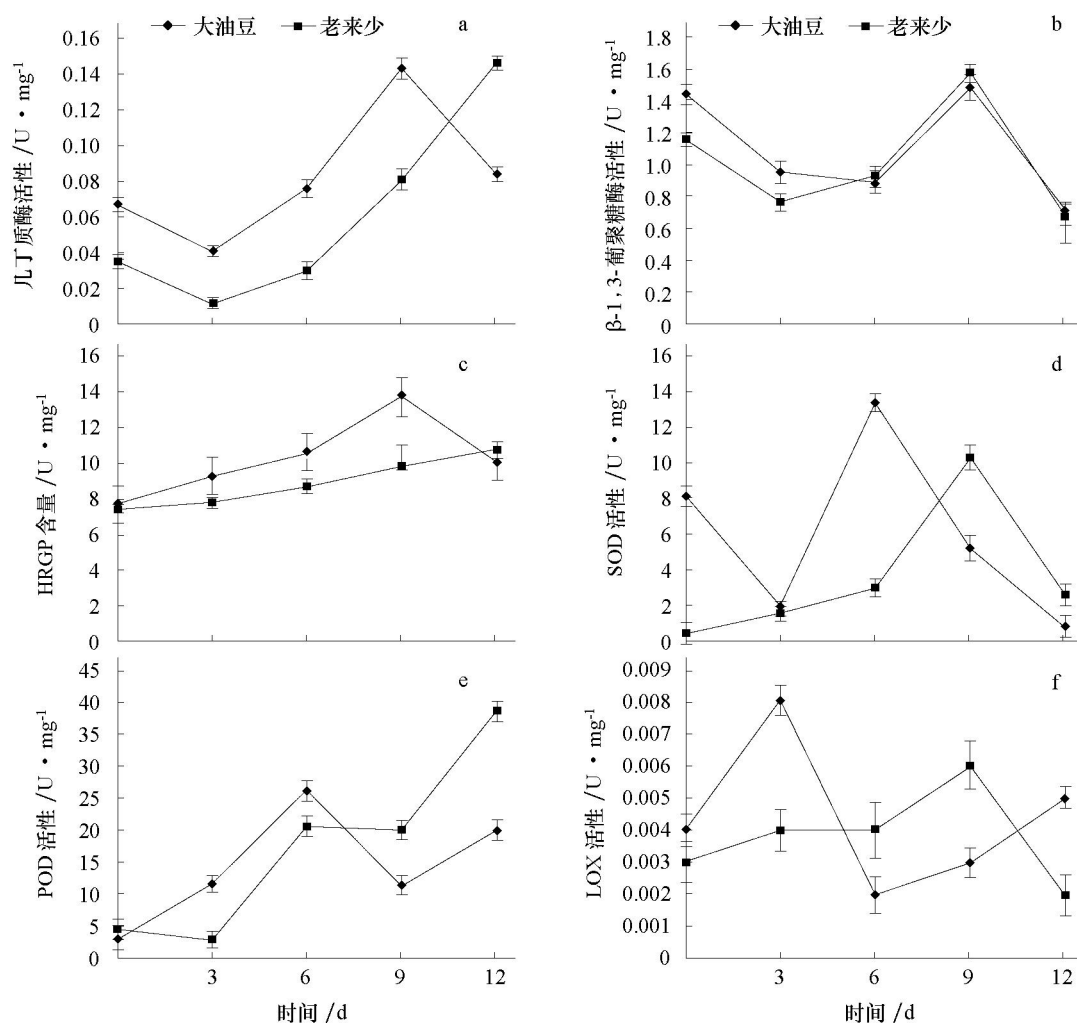


图 1 两种油豆角接种炭疽病病菌后 5 种酶活性及 HRGP 含量的变化

恢复直到 12 d 时达到 0 d 水平。感病品种老来少接种后酶活性 6 d 内无明显变化, 9 d 时上升到最大值, 但在 12 d 时又急剧下降且低于 0 d 水平。

### 3 结论与讨论

植物有一系列复杂的防御机制来保护其不受真菌、细菌、病毒、支原体、线虫等病原物的侵袭, 如产生加固和阻止病原生长的细胞壁成分、合成小分子抑制真菌物质、诱导产生各种病程相关蛋白、蛋白酶抑制剂的生成、释放各种活性氧以及发生过敏性反应等。

史娟和李建设(2006)对于枯萎病诱导几丁质酶活性的研究发现, 抗病品种中几丁质酶活性变化要快于感病品种, 且活性要高于感病品种, 本试验也证实了这一点。本试验中还发现, 抗病品种初期几丁质酶活性高于感病品种, 并且酶活性增加的速度要高于感病品种, 但不是持续升高的表达, 而是在 3~9 d 时有明显跃升, 之后有所下降, 这可能是在此时间段内酶活性的跃变对抗病起到了关键性作用。在 12 d 左右, 老来少中几丁质酶活性高于大油豆, 但可能其已错过抗病的最佳时期。此结果与 Shao 和 Teri(1985)发现菜豆侵染后 4~7 d 出现病发症相吻合。

在本试验中, 老来少和大油豆中  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性在接种后均发生了改变, 由此表明  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性与油豆角抗炭疽病有关联, 这与蒋跃明等(1995)研究芒果果实中的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性会随着潜伏真菌的活化而逐渐升高的结果相似。但是抗病品种的初期酶活性高于感病品种, 而且二者在受侵染后酶活性的变化趋势相似, 说明受侵染前期的酶活表达有可能起到了关键作用。

HRGP 既是参与结构抗性因子之一, 也是形成结构抗性生化因子之一, 结构抗性不能有效地抵御病原物侵染时, 植物就会调动下一步的抵御反应(Veit et al., 2001)。本试验结果表明, 大油豆中 HRGP 含量在接种后要比老来少上升较快, 且达到峰值早, 在 9 d 上升至最高点, 可见跃升的幅度和表达量与抗性关联较大, 这与许勇和葛秀春(2009)的研究结果相似。

在植物与病原物互作中, 寄主体内 SOD 活性变化与植物病害系统和互作类型有关。一般来讲, 亲和互作引起的感病反应 SOD 活性会升高, 非亲和互作引起的抗病反应 SOD 活性无明显变化或有所下降(宋凤鸣等, 1996)。在本试验中, 两个品种在接种后 SOD 活性均有明显的变化, 这与王利国(2004)对墨兰抗炭疽病的研究结果相似。本试验结果表明, 抗性品种 SOD 活性最高值大于感病品种, 且出现高峰值的时间比感病品种提前 3 d 左右; 而在 9 d 后感病品种, SOD 活性高于抗病品种, 但是可能已经错过抗病的最佳时期, 从而作用不明显。

在本试验中, 两种油豆角在接种炭疽病后 POD 活性均发生了变化, 说明 POD 与抗病是有关系的, 这与胡青平等(2007)研究的结果相似。本试验中大油豆 POD 活性的高峰期要早于老来少, 在 6 d 时跃升至峰值, 之后呈下降趋势, 而老来少 POD 活性则呈逐渐上升趋势。POD 在杀菌自由基浓度的提高与 HRGP 的高级结构形成中起重要作用(Ray & Hammerschmidt, 1998)。

植物 LOX 的生理功能是为植物激素提供合成前体物, 如茉莉酸(JA)及其甲酯和愈创激素(Croft et al., 1993), 其代谢产物中含有活性氧和氧自由基, 对细胞膜具有一定的破坏作用, 因而参与植物的衰老和抗病性过敏坏死反应(Keppler & Novacky, 1987; Melan et al., 1993)。本试验结果表明, 两种油豆角在接种炭疽病菌后 LOX 活性均发生变化, 大油豆在受侵染后 LOX 活性上升较快, 在 3 d 时达到跃变峰值, 且远高于老来少, 之后呈下降趋势, 低于老来少, 这和秦引萍等(1996)研究水稻受到稻瘟菌侵染的结果相似。

综上所述, 油豆角抗病品种中几丁质酶、POD、SOD、LOX 活性及 HRGP 含量均在接种后早期高于感病品种, 且酶活性和 HRGP 含量升高更快、更强, 早期即达到峰值, 说明菜豆炭疽病抗病反应可能与膜脂过氧化、木质素和植保素积累等抗性反应有关。而接种后感病、抗病品

种的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶变化趋势相同。

### 参考文献

- 蔡武城, 袁积厚. 1982. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社: 81.
- 高明波, 柳展基, 于翠梅, 曹萍, 刘世强. 1999. 盐胁迫水稻愈伤组织的生理生化指标检测. 沈阳农业大学学报, 30(4): 404-407.
- 胡国富, 李凤兰, 李成雁, 李鹤春, 尹智, 谷月娇, 詹云. 2010. 不同成熟菜豆(油豆角)产量性状的相关性和主成分分析. 中国蔬菜, (6): 24-27.
- 胡青平, 徐建国, 薄芳芳, 陈五岭. 2007. 烟草感染青枯菌前后 POD 及同工酶的变化. 中国农学通报, 23(6): 497-500.
- 蒋跃明, 马国华, 陈芳. 1995. 芒果采后潜伏真菌活化与几丁酶、 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶的研究. 植物保护学报, 22(1): 80-84.
- 罗广华, 王爱国. 1999. SOD 活性测定//中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社: 314-315.
- 秦引萍, 杨依军, 彭友良, 曾士迈. 1996. 稻瘟菌感染诱导性水稻脂氧合酶的同工酶鉴定及性状分析. 农业生物技术学报, 4(2): 180-188.
- 史娟, 李建设. 2006. 枯萎病菌诱导的几丁质酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶与寄主抗病性的关系. 农业科学研究, 27(3): 24-26.
- 史益敏. 1999.  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性的测定//中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社: 128.
- 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 1996. 活性氧及膜质过氧化在植物-病原物互作中的作用. 植物生理学通讯, 32(5): 977-985.
- 王钧. 1995. 植物抗病研究的进展. 植物生理学通讯, 31(4): 312-317.
- 王利国. 2004. 墨兰与炭疽菌互作的抗病生理及抗菌肽抑菌作用研究〔博士论文〕. 广州: 华南师范大学.
- 王述民, 张亚芝, 魏淑红, 李锡香. 2006. 普通菜豆种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社.
- 吴全安. 1991. 粮食作物种质资源抗病虫鉴定方法. 北京: 农业出版社.
- 修殿权, 石晓华, 王冰寒. 2009. 吉林省油豆角种质资源的研究与利用. 中国种业, (3): 47.
- 许勇, 葛秀春. 2009. 枯萎病菌诱导的结构抗性和相关酶活性的变化与西瓜枯萎病抗性的关系. 果树学报, 17(2): 123-127.
- 詹云, 郭牧, 王雪. 2006. 黑龙江菜豆(油豆角)种质资源的收集整理与利用. 中国蔬菜, (s): 22-24.
- Axelrod B, Cheesbrough T M, Leakso S. 1981. Lipoxygenase from soybeans. Methods in Enzymology, 71: 441-451.
- Boller, Gehri A. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. Planta, 157: 22-31.
- Croft K P C, Jüttner F, Slusarenko A J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Plant Physiology, 1: 13-24.
- Davis D, Merida J, Legendre L, Low P S, Heinsteint P. 1993. Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. Phytochemistry, 32(3): 607-611.
- Keppler L D, Novacky A. 1987. Initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria induced hypersensitive reaction. Physiol Mol Plant Pathology, 30: 233-245.
- Melan M A, Dong X, Endara M E, Davis K R, Ausubel F M, Peterman T K. 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens: abscisic acid, and methyl jasmonate. Plant Physiology, 101: 441-450.
- Ray H, Hammerschmidt R. 1998. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 53(2): 81-92.
- Shao F M, Teri J M. 1985. Yield losses in *Phaseolus* beans induced by anthracnose in Tanzania. Tropical Pest Management, 31(1): 60-62.
- Veit S, Wörle J M, Nümberger T, Koch W, Seitz H U. 2001. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, Arabidopsis, and tobacco. Plant Physiology, 127: 832-841.