

## 病毒侵染对转 *SCMV-CP* 基因甘蔗 光合速率和活性氧代谢的影响

姚 伟<sup>1,2\*</sup>, 段真珍<sup>1</sup>, 陈义强<sup>2</sup>, 何正权<sup>1</sup>, 张木清<sup>2</sup>, 陈如凯<sup>2</sup>

(1. 三峡大学 生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443002; 2. 福建农林大学 农业部甘蔗  
生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建 福州 350002)

**摘 要:** 对转 *SCMV-CP* 基因甘蔗叶绿素含量、光合参数、活性氧代谢有关的酶活性进行了测定分析, 结果表明转基因甘蔗由于外源 *CP* 基因的导入, 病毒在植株体内无法正常复制繁殖, 从而保护了植株细胞免受因病毒侵染造成的伤害。未转基因甘蔗接种后病毒迅速繁殖蔓延, 受害叶片对活性氧清除能力的下降, 促使有毒物质活性氧的积累, 启动膜脂过氧化, 造成膜的损伤。

**关键词:** 甘蔗; 花叶病毒; 活性氧代谢

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)01-0095-05

## Effects of virus infection on the photosynthetic rate and reactive oxygen metabolism of transgenic sugarcane with *SCMV-CP* gene

YAO Wei<sup>1,2\*</sup>, DUAN Zhen-Zhen<sup>1</sup>, CHEN Yi-Qiang<sup>2</sup>,  
HE Zheng-Quan<sup>1</sup>, ZHANG Mu-Qing<sup>2</sup>, CHEN Ru-Kai<sup>2</sup>

(1. *Biotechnology Research Centre, Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China*)

**Abstract:** Through the analysis of chlorophyll, parameter of photosynthesis and enzyme in the metabolism of reactive oxygen species, a conclusion was drawn that the transformants of *CP* gene can protect sugarcane cell from the virus damage. But in the nontransgenic sugarcane plants, the virus spreaded out after inoculation, and the tissues were seriously damaged by the accumulation of harmful active oxygen.

**Key words:** sugarcane; mosaic virus; active oxygen metabolism

甘蔗花叶病(Sugarcane mosaic disease), 又称甘蔗嵌纹病, 是一种严重危害甘蔗生长的世界性病害(周仲驹等, 1989)。作为一种高度杂合的无性繁殖作物, 甘蔗遗传背景非常复杂, 一般表现为异源多倍体和多倍的非整倍体, 其染色体数目多, 基因组巨大, 在不同种间或同一种内的不同类型之间染色体数目差异很大, 从  $2n=54$  到多的  $2n=128$ (秦新民等, 1989;

李素丽等, 2004)。在甘蔗栽培种的种质中表现缺乏许多重要的抗性性状, 所以要想通过常规的杂交育种方法在优良品种中引入抗性基因是非常困难的(Arencibia 等, 1997)。转基因技术的日趋成熟在这方面开辟了一条全新的途径, 使在优良品种中导入目的基因进行品种改良成为可能, 形成了一种高效的育种方法。自从 Powell 等成功地将 TMV 外壳蛋白导入到

收稿日期: 2006-06-27 修回日期: 2006-10-28

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目(2002AA241031) [Supported by National High Technology Research and Development Program of China (2002AA241031)]

作者简介: 姚伟(1977-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 主要从事植物生物技术方向的研究, (E-mail) yaoweimail@163.com.

\* 通讯作者(Author for correspondence)

烟草,获得了抗烟草花叶病毒 TMV 侵染的转基因植株以来(Powell-Abel,1986),到目前为止,已有很多个植物病毒组的病毒的 CP 基因成功转入多种植物中去。我们于 2003 年成功地将 SCMV-CP 基因导入甘蔗中,获得了抗病毒的转基因甘蔗植株(姚伟等,2004)。本试验的主要目的是分析比较抗病毒转基因植株在光合速率和活性氧代谢上的变化,以期探讨其抗病机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

已转入 SCMV-CP 基因的甘蔗 Badila 亚无性系一代及转基因的供体材料作为对照(Badila 原种和组培苗)。材料种植于福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室的网虫室内。

### 1.2 病毒粗提物

用于田间病毒接种的病毒粗提物的制备参照周仲驹等(1989)方法;严重感染花叶病的病叶加 3 倍量的(v/w)0.1 mol/L pH7.2 含 NaSO<sub>3</sub> 的磷酸缓冲液,经高速组织捣碎机捣碎 5 min,双层纱布过滤榨汁或 15 000 g 离心 10 min,取上清。

### 1.3 叶绿素含量及其光合参数的测定

1.3.1 光合参数的测定 幼苗长至 9-10 片真叶时,光控条件下(PAR=1 000 μmol/(m<sup>2</sup>·s)),用 CI301PS 型便携式 CO<sub>2</sub> 气体分析系统活体测定 4 个光合参数:光合速率(Pn)、蒸腾速率(E)、气孔导度(C)、和胞间 CO<sub>2</sub> 浓度(CO<sub>2</sub>int),连续观测 3 次,取平均值作为观测值。

1.3.2 叶绿素含量的测定 参照陈福明等(1984)的混合液法,称取待测叶片 0.1 g,用 80%的丙酮溶液避光抽提,直到叶片发白为止。然后用核酸蛋白测定仪测定 645、625 nm 和 663 nm 处的 O. D. 值,根据公式计算出叶绿素 a、叶绿素 b 以及叶绿素总含量,各设 3 次重复。

### 1.4 POD、SOD、CAT、MDA 的测定

选择生长一致的转基因植株亚无性系、组培苗和原种苗进行接种处理,同时以接种磷酸缓冲液为对照,分别在接种后 0、2、4、6、8、10d 取样,测定其过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的变化。参照梁和等(1995)的方法提取粗酶液。称取待测叶片 1 g,用 5 mL 冰冷的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)和少量石英砂冰浴研磨,匀浆

后 4 °C 下 8 000 g 离心 15 min,上清液用于测定过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性。酶液的蛋白质含量测定采用考马斯亮兰法(Bradford MM,1976)。

过氧化物酶(POD)酶活性测定参照李杨瑞(1990)的方法进行;POD 同工酶分析采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,参照袁晓华等(1983)的方法进行;超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照 Giannoplitis 等(1977)方法进行;过氧化氢酶(CAT)活性的测定参照波钦诺克等(1981)的方法;丙二醛(MDA)含量的测定按照 Heath 等(1968)的方法进行。

## 2 结果和分析

### 2.1 叶绿素含量及其光合参数的变化

当转基因 Badila 长至 9~10 片叶子时,测定其叶绿素 a、b 及总叶绿素含量,如图 1 所示。

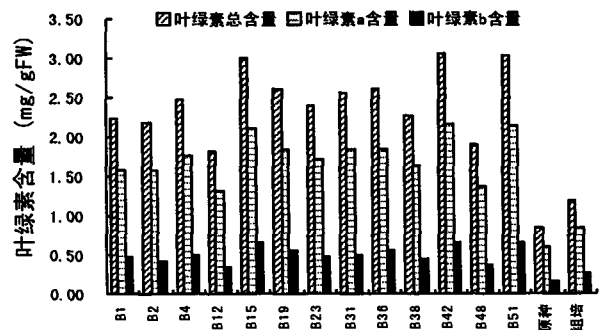


图 1 转基因及未转基因 Badila 叶绿素含量的比较

Fig. 1 Comparison of chlorophyll in transformant and untransformant

由图 1 可以看出,转基因 Badila 叶片中叶绿素含量明显高于未转基因的 Badila 组培苗,未转基因的 Badila 原种苗最低。由此表明,由于病毒的侵染,未转基因 Badila 体内叶绿体破坏比较严重,叶绿素含量低,而转基因 Badila 体内由于导入了 CP 基因,能阻止外源病毒的入侵,叶绿体没有遭到破坏,其叶绿素含量维持在较高的水平。主要光合参数测定,也得到同样的结果(表 1),转基因 Badila 的净光合速率高于未转基因的组培苗和原种苗。

### 2.2 POD 酶活性的变化

图 2 结果表明,未接种时,转基因 Badila 叶片内 POD 的活性稍高于 Badila 组培和原种苗,接种后 4~8 d,转基因和未转基因 Badila 叶片的 POD 活性都有

增高的趋势,但未转基因 Badila 的增高幅度大于转基因 Badila,组培和原种苗增高幅度接近。随后转基因 Badila 的 POD 活性呈现下降趋势,而未转基因 Badila 的 POD 活性有继续增高的趋势。

表 1 转基因及未转基因 Badila 光合参数的变化  
Table 1 Variations of photosynthetic parameters in transformant and untransformant

株系 Strain	净光合速率 (Pn) Net photosynthetic rate ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	蒸腾速率 (E) Transpiration rate ( $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	气孔导度 (C) Stomatal conductance ( $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	胞间 CO <sub>2</sub> 浓度 CO <sub>2</sub> int (ppm)
B1	13.10	1.01	97.50	37.56
B2	14.12	1.19	98.30	81.30
B4	14.63	1.35	100.23	75.90
B12	10.54	1.12	94.90	86.60
B15	16.43	1.52	112.50	70.54
B19	16.32	0.99	110.25	23.10
B23	14.70	1.14	97.75	73.30
B31	15.05	1.22	103.50	54.68
B36	16.25	0.89	107.65	32.50
B38	13.58	1.54	95.59	89.32
B42	20.36	0.96	116.40	24.20
B48	12.63	1.93	143.55	78.23
B51	19.23	0.85	123.96	85.63
原种 Un-transformant	7.26	1.95	87.40	88.25
组培 Trans-formant	9.05	1.81	94.54	92.67

注: 三次测定结果的平均值。Note: The average of three tests.

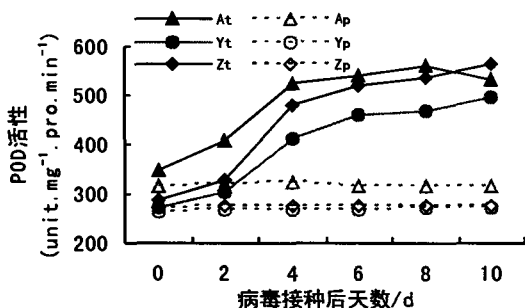


图 2 接种后甘蔗叶片内 POD 活性的变化  
Fig. 2 Changes of peroxidase activity in sugarcane leaves after inoculation

At, Yt, Zt: 分别为接种病毒后的转基因 Balida, Balida 原种苗和 Balida 组培苗; Ap, Yp, Zp: 分别为未接种病毒的转基因 Balida、Balida 原种苗和 Balida 组培苗。下同。

At, Yt, Zt: Transformant, original seedling, test-tube plantlet after inoculation; Ap, Yp, Zp: Transformant, original seedling, test-tube plantlet without inoculation. The same as follows.

可能由于病毒粒子侵染后破坏了膜的正常结构与功能,生物膜系统受损,细胞膜透性增加,酶与底物

无控制地接触,从而表现为酶促反应加速,酶活性提高。可以认为,接种 POD 后,甘蔗叶片体内 POD 活性的提高是膜系统受到伤害的结果,而转基因甘蔗具有较高的 POD 活性,由它催化所形成的木质素和植保素等次生抗性物质足以抵抗和限制病毒粒子的侵入和扩散。

### 2.3 POD 同工酶谱的变化

同工酶分析的结果,如图 3 所示。从图 3 中可以看出,未接种时,转基因与未转基因 Badila 叶片内 POD 同工酶谱带基本一致,但在病毒接种后,转基因 Badila 在接种后第 2 天即出现一条新的酶带,持续出现直到第 10 天酶谱带消失。而未转基因 Badila 在该区没有出现该酶带,在接种后第 6 天, Balida 组培苗出现特异酶带的上方区域出现了新的酶带, Balida 原种苗到接种后第 8 天也出现了该酶带,而且随接种天数增加而增强,这一结果与 POD 酶活性测定结果基本一致。



图 3 接种后甘蔗叶片内 POD 同工酶电泳图谱  
Fig. 3 Isozyme pattern of POD in sugarcane leaves after inoculation

A0-10, Y0-10, Z0-10: 分别为转基因 Balida, Balida 原种苗和 Balida 组培苗接种后天数。

A0-10, Y0-10, Z0-10: Days after inoculation for transformant, original seedling and test-tube plantlet respectively.

### 2.4 SOD 活性的变化

随着病毒接种天数的变化,转基因和未转基因 Balida 体内 SOD 活性也发生了不同变化,结果如图 4。

由图可以看出,接种后 2 d,转基因 Balida 叶片内 SOD 活性迅速上升,到第 4 天达到最大,随后逐渐下降,最后接近未接种前的水平。而未转基因 Balida 开始 SOD 活性缓慢上升,到第 6 天达到最大值,随后也呈现下降的趋势。

### 2.5 CAT 活性的变化

在接种后,转基因与未转基因 Balida 体内 CAT 酶活性都有所变化,如图 5 所示。转基因 Balida 叶片中, CAT 活性在接种处理后变化幅度比较大,而

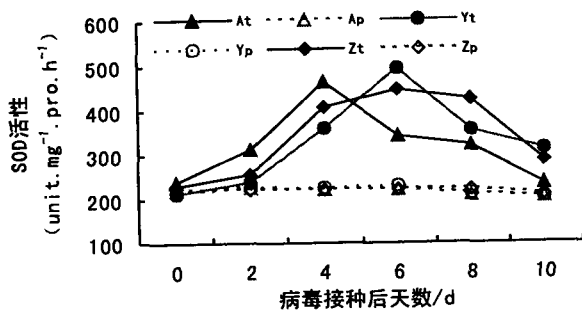


图4 接种后甘蔗叶片内 SOD 活性的变化  
Fig. 4 Changes of SOD activity in sugarcane leaves after inoculation

Badila 的组培和原种苗的 CAT 活性没有发生太大的变化。

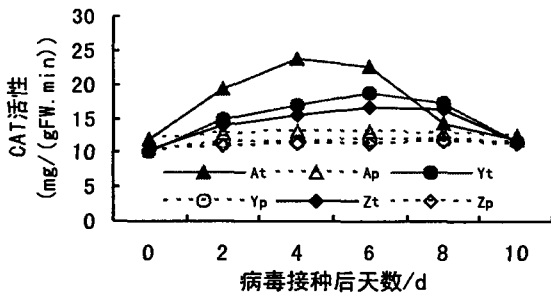


图5 接种后甘蔗叶片内 CAT 活性的变化  
Fig. 5 Changes of CAT activity in sugarcane leaves after inoculation

## 2.6 MDA 含量的变化

抗病反应中,高水平积累的活性氧和迅速升高的脂氧合酶(Lipoxygenase,Lox)活性可直接攻击膜系统中的不饱和脂肪酸,导致膜脂过氧化发生,表现为MDA的积累,由图6可以看出,病毒接种后,未转基因Badila叶片内的MDA含量上升幅度很大,在接种10d后仍然保持较高的水平,而转基因Badila的MDA变化不大,在接种后6d开始下降,逐渐恢复至接种前水平。充分说明当受到病毒侵染后,未转基因品种膜系统受到的破坏严重,膜脂的过氧化使得MDA大幅上升,而转基因品种因为导入了CP基因,病毒的侵染受到控制,膜系统受到的破坏较小,MDA含量变化不大。

## 3 讨论

植物在正常情况下,体内产生活性氧与清除活性氧保持平衡状态,使植物免受伤害。当植物病毒

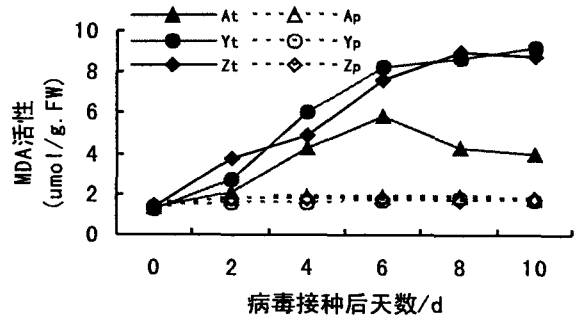


图6 接种后甘蔗叶片内 MDA 活性的变化  
Fig. 6 Changes of MDA content in sugarcane leaves after inoculation

侵染或其它逆境胁迫时,细胞内原有的活性氧产生与清除平衡会遭到破坏,造成活性氧和自由基的累积,直接攻击膜系统中的不饱和脂肪酸。直接或间接地启动膜脂过氧化,导致膜的损伤和破坏,表现为MDA的积累,对生物体起着毒害作用。同时植物体内也存在清除活性氧的酶(SOD、POD、CAT)和非酶物质(GSH、AsA、Ve、类胡萝卜素)两类防御系统。SOD能催化超氧阴离子自由基歧化成 $H_2O_2$ ,而POD、CAT能清除 $H_2O_2$ ,把 $H_2O_2$ 还原成没有毒性的水(透明辉等,2005)。本研究对转SCMV基因和未转基因的Badila进行病毒种处理后,在病毒诱导下,植株体内清除活性氧的酶活性发生了变化。在转基因的Badila体内,由于外源CP基因的导入,可能对SCMV病毒的侵染产生了很高抗性,使病毒在植株体内无法正常复制繁殖,从而保护了植株细胞免受因病毒侵染造成的伤害。未转基因Badila不具有病毒抗性,接种后病毒迅速繁殖蔓延,受害叶片对活性氧清除能力的下降,可能促使有毒物质活性氧积累,启动膜脂过氧化,造成膜的损伤,因此膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量不断增加。而转基因Badila具有很高的酶促保护能力,活性氧代谢反应迅速启动,未造成活性氧的积累,从而保护细胞膜系统免受损害。POD是植物体内最重要的氧化酶,能催化脂肪酸、芳香胺和酚类物质的氧化,是木质素合成的关键酶之一,还参与乙烯的生物合成和氧自由基的消除反应,其与植物的抗性密切相关(顾龚平等,2000;杨涛等,2004)。病毒接种处理后转基因与未转基因品种中POD活性都升高,但转基因品种升高的早且幅度比未转基因的大。从第8天开始转基因品种POD活性有下降的趋势,而未转基因品种继续保持上升的趋势;POD的同工酶谱分析结果与POD酶活性测定结果基本一致,转基因Badila

从第 2 天开始出现一条新的酶带,第 10 天时该酶带消失,推测该酶带与甘蔗的病毒抗性密切相关。

### 参考文献:

- X. H 波钦诺克, 荆家海, 丁钟荣(译). 1976. 植物生物化学方法 [M]. 科学出版社: 203—207
- 陈福明, 陈顺伟. 1984. 混合液法测定叶绿素含量的研究 [J]. 浙江林业科技, 4(1): 19—23
- 李杨瑞. 1990. 甘蔗组织中过氧化物酶活性及其与生长和工艺成熟的关系初探 [J]. 广西农学院学报, 9(1): 13—18
- 周仲驹, 黄如娟, 林奇英, 等. 1989. 甘蔗花叶病的发生及甘蔗品种抗性 [J]. 福建农学院学报, 28(4): 520—525
- 袁晓华, 杨中汉. 1983. 植物生理生化实验 [M]. 北京: 高等教育出版社: 36—40
- 梁和, 李杨瑞. 1995. 不同浓度乙烯利处理对甘蔗若干生理生化特性的影响 [J]. 广西农业大学学报, 14(1): 1—8
- Arencibia A, Vazquez RI, Prieto D, et al. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack [J]. *Molecular Breeding*, 3(4): 247—255
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Gu GP(顾龚平). 2000. Effect of PEG on vigour index and active oxygen metabolism in soybean seeds (PEG 处理对大豆幼苗活力及活性氧代谢的影响) [J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 22(2): 26—30
- Giannopitis CN, Rice SK. 1977. Superoxide dismutase purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [J]. *Plant Physiol*, 39: 315—318

- Heath RL, Parker L. 1968. Photoperitration in isolated chloroplasts kinetics and stoichimetry of fat acid peroxidation [J]. *Arch Biophys*, 25: 189—198
- Li SL(李素丽), Lin JZ(林鉴钊), Wang JL(王俊丽), et al. 2004. Study on the cell division rhythm of different sugarcane varieties(不同品种甘蔗茎尖细胞分裂节律研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), 24(2): 188—192
- Lu MH(逯明辉), Song H(宋慧), Li XM(李晓明), et al. 2005. Changes of SOD, CAT and POD activities in cucumber leaves during cold damage(冷害过程中黄瓜叶片 SOD, CAT 和 POD 活性的变化) [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报) [J], 25(8): 1 570—1 573
- Powell-Abel P, Nelson RS, De B Hoffman N, et al. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene [J]. *Science*, 232: 738—743
- Qin XM(秦新民), Liang QH(梁倩华), Huang ZY(黄卓瑶), et al. 1989. A preliminary study on chromosome number variation in tissue culture of sugarcane(甘蔗组织培养中染色体数目变异的初步研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), 9(4): 327—330
- Yang T(杨涛), Li CY(李传勇), Tang HH(汤惠华). 2004. Effects of dimethoate on activities of POD, SOD, CAT and MDA content in spinach leaves(乐果对菠菜叶片 POD, SOD, CAT 活性及 MDA 含量的影响) [J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), 33(4): 19—21
- Yao W(姚伟), Yu AL(余爱丽), Chen RK(陈如凯), et al. 2004. Analysis and identification for transgenic sugarcane of SCMV-CP gene(转 SCMV-CP 基因甘蔗的分子生物学分析与鉴定) [J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2(1): 13—18

(上接第 76 页 Continue from page 76)

植物区系形成了鲜明对比; 温带、寒温带物种丰富, 欧亚高山植物属种几乎应有尽有; 区系成分多样, 分化激烈, 地理联系广泛, 替代现象明显; 高山花卉和现代松柏类植物的多样化中心; 东亚特有科和单型中国特有科丰富, 多古老、原始的单型属和寡型属; 滇西北不可多得的高山植物种质资源基因库; 保护区植物在植物进化舞台上, 扮演着极其重要的角色, 是研究植物地理不可多得的好场所。

由于整个山脉呈南北走向, 故使其成为南北物种汇集、迁移和扩散的主要通道, 许多物种在迁移的过程中, 在此定居下来, 并在新的环境中产生分化, 形成许多特有种, 仅中国特有种子植物就有 883 种, 占保护区种子植物总数的 51.8%。富含横断山区特有种和中国特有种, 同时滇西北特有种也较丰富, 但保护区自身特有种少。所有的特有种在地理分布上都有局限性, 如果这些物种在该地区丧失, 则意味着该分类单元在整个地球上的消失。因此, 白马雪山自然保护区的特有物种应该受到特别关注。

### 参考文献:

- 吴征镒. 1984. 云南种子植物名录(上、下册) [M]. 昆明: 云南人民出版社
- 吴征镒. 1985—1986. 西藏植物志 1—5 卷 [M]. 北京: 科学出版社
- 中国科学院昆明植物研究所. 1985—1998. 云南植物志 1—8 卷 [M]. 北京: 科学出版社
- 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 1997. 横断山区自然地理 [M]. 北京: 科学出版社
- 王文采. 1993. 横断山区维管束植物(上、下册) [M]. 北京: 科学出版社
- 方震东. 1993. 横断山区野生花卉 [M]. 昆明: 云南人民出版社
- 吴征镒, 丁托娅. 1999. 中国种子植物数据库(光盘) [DB]. 昆明: 云南科技出版社
- 应俊生. 1994. 中国种子植物特有属 [M]. 北京: 科学出版社
- Yang QE(杨亲二), Fang ZD(方震东). 1990. New taxa of the genus *Aconitum* from Yunnan(云南乌头属植物新分类群) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 12(4): 387—391
- Li XW(李锡文). 1996. Floristic statistics and analyses of seed plants from China(中国种子植物区系统计分析) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 18(4): 363—384
- Huang J(黄娟). 2000. Characteristics of plant biodiversity in north-western Yunnan(滇西北植物多样性) [J]. *Yunnan Fore Sci Tech* (云南林业科技), 93(4): 41—45