

侯 茜,羊杏平,张 曼,等. 西瓜幼苗根系防御酶活性变化与枯萎病抗性的关系[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):147-149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.044

西瓜幼苗根系防御酶活性变化与枯萎病抗性的关系

侯 茜,羊杏平,张 曼,徐锦华,刘 广

(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:以西瓜抗病品种卡红和感病品种苏蜜一号为材料,研究西瓜幼苗接种枯萎病菌后西瓜幼苗根部组织的生理生化变化与抗病性的关系。结果表明,苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、几丁质酶(CHO)、 β -1,3-葡聚糖酶(GUN)的活性与抗病性呈正相关。初步认为,可用西瓜幼苗根部 PAL、POD、PPO、CAT、CHO、GUN 的活性作为反映苗期西瓜材料枯萎病抗性的生理生化指标。

关键词:西瓜;幼根组织;枯萎病;酶活性

中图分类号:S436.5;S651.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0147-03

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON) 侵染引起的一种世界性真菌土传病害^[1]。近年来,西瓜种植面积不断扩大,造成轮作困难,致使枯萎病的危害逐年加重,给西瓜生产造成严重危害,该病害已成为影响我国瓜类优质、高效生产的主要障碍^[2]。

本试验以枯萎病高抗西瓜品种卡红和高感西瓜品种苏蜜一号为材料,通过苗期人工接种西瓜枯萎病菌,研究西瓜幼苗根系内一系列防御酶如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、几丁质酶(CHO)和 β -1,3-葡聚糖酶(GUN)的活性变化与抗病性的关系。

1 材料与与方法

1.1 材料

西瓜材料选用国际公认的抗枯萎病生理小种 1 的西瓜品种卡红和感病品种苏蜜一号,由江苏省农科院蔬菜所瓜类研究室提供。

枯萎病菌选用国际公认的尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fu-*

sarium oxysporum f. sp. *niveum*)1 号生理小种。

1.2 方法

1.2.1 西瓜苗的培养 西瓜种子经 55 ℃ 温汤浸种 6~8 h 后,用纱布包裹置于 30 ℃ 恒温培养箱中催芽,待 80% 种子露白后播种在 50 孔穴盘内。置于人工气候箱内进行育苗,育苗基质使用 0~6 mm 进口品氏托普泥炭。

1.2.2 接种 西瓜病原菌接种按国际通用的幼苗浸根法^[3],待西瓜苗长至 2~3 张真叶时拔出,洗净根部泥炭,在枯萎病菌孢子悬浮液(1×10^6 个/mL)中浸根 30 min,然后重新栽入无菌基质中,置于 28 ℃ 的光照培养箱(12 h/d, RH 为 70%)。接种后分别于 0、1、2、5、7、10 d 取西瓜苗根组织,进行苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶、几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶的活性测定。设置 3 次重复。

1.2.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定 参照许勇等的方法^[4],取西瓜幼根组织用 0.1 mol/L、pH 值为 8.8 的硼酸缓冲液(内含 2% PVP),在冰浴中匀浆后离心(15 000 g, 15 min),取上清液为酶液测定酶活性。反应液为 1.5 mL 硼酸缓冲液(含 10 mol/L 苯丙氨酸)加 0.2 mL 酶液,40 ℃ 反应 1 h 后,加 0.3 mL 5 mol/L HCl 终止反应,测 $D_{290\text{ nm}}$ 。

1.2.4 过氧化物酶(POD)活性的测定 参照许勇等的方法^[4]取西瓜幼根组织用 50 mmol/L、pH 值为 7.8 的磷酸缓冲液(内含 2% PVP)在冰浴中匀浆后离心(15 000 g, 15 min),取上清液测定酶活性(采用愈创木酚法),反应液为 25 mmol/L、pH 值为 7 的磷酸缓冲液(含 0.1 mol/L EDTA) 1.7 mL;1% 愈创木酚 100 μ L, 20 mmol/L 双氧水 100 μ L 和

收稿日期:2015-09-24

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)(编号:2012AA100103);国家西瓜产业技术体系(编号:CARS-26-NO.8);江苏省科技支撑计划(编号:BE2012323)。

作者简介:侯 茜(1987—),女,江苏南京人,研究实习生,从事西瓜遗传育种研究。E-mail:659220544@qq.com。

通信作者:羊杏平,博士,研究员,主要从事西瓜甜瓜遗传育种研究。E-mail:1394654153@qq.com。

[11]何觉民. 关于小麦抗赤霉病育种的研究——I. 小麦品种形态与抗赤霉病性关系的初探[J]. 湖南农学院学报,1983,9(2):9-18.

[12]Gervais L, Dedryver F, Morlais J Y, et al. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(6): 961-970.

[13]吕 超,姚 琴,周荣华,等. 小麦 Am3/莱州 953 近等基因导入系赤霉病抗性鉴定[J]. 江苏农业科学,2012,40(12):96-99.

[14]王雅平,王进先,刘伊强. 小麦品种对赤霉病抗扩展性的遗传研究[J]. 作物学报,1992,18(5):373-379.

[15]Hilton A J, Jenkinson P, Hollins T W, et al. Relationship between cultivar height and severity of *Fusarium* head blight in wheat[J]. Plant Pathology, 1999, 48(2):202-208.

[16]陆维忠,刘芬兰,林一波,等. 主要农作物抗病性遗传研究进展[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1990:229-235.

[17]刘 力,李新予. 不同严重度分级方法下小麦赤霉病病情指数的比较[J]. 植物保护学报,1988,15(1):41-44.

100 μL 酶液,测 $D_{470\text{ nm}}$ 。

1.2.5 多酚氧化酶(PPO)活性的测定 取西瓜幼根组织用 50 mmol/L、pH 值 6.8 的磷酸缓冲液(内含 2% PVP)在冰浴中匀浆后离心(15 000 g , 15 min),取上清液测定酶活性测定(采用苯二酚比色法测定^[5]),反应液为 50 mmol/L、pH 值 6.5 的磷酸缓冲液 2.4 mL, 20 mmol/L 邻苯二酚 0.5 mL(用 50 mmol/L、pH 值 6.8 的磷酸缓冲液配制)和 100 μL 酶液,在 32 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 min 后,测 $D_{410\text{ nm}}$ 。

1.2.6 过氧化氢酶(CAT)活性的测定 取西瓜幼根组织用 50 mmol/L、pH 值 7.8 的磷酸缓冲液(内含 2% PVP)在冰浴中匀浆后离心(15 000 g , 15 min),取上清液,按孙正祥的方法^[6]测定。反应液为 25 mmol/L、pH 值 7 磷酸缓冲液(含 0.1 mol/L EDTA)1.7 mL, 100 mmol/L 过氧化氢 200 μL 和酶液 100 μL ,测 $D_{240\text{ nm}}$,过氧化氢边加边测。

1.2.7 几丁质酶(CTH)活性的测定 参照史娟等的方法^[7],取西瓜幼根组织加预冷的 50 mmol/L、pH 值 6.4 的磷酸缓冲液在冰浴中匀浆,匀浆后冷提 2 h, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液为待测酶液。取酶液 500 μL ,与 500 μL 胶状几丁质(5 mg/mL)及 100 μL 磷酸缓冲液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h,冷却后离心取上清液 500 μL 加 0.8 mol/L 四硼酸钾 100 μL ,沸水中加热 3 min,冷却后加 DMAB(对-二甲氨基苯甲醛)试剂 3 mL,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min,冷却后测 $D_{585\text{ nm}}$,根据葡萄糖标准曲线计算反应液中 N -乙酰葡萄糖胺的含量,以 1 h 1 g 鲜组织从胶状几丁质中释放 1 g N -乙酰葡萄糖胺为 1 个酶活性单位(U)。

1.2.8 β -1,3 葡聚糖酶(GUN)的活性测定 参考田菲菲的方法^[8],称取西瓜幼根组织 0.5 g,加入预冷的 1 mL 0.1 mol/L、pH 值 5.0 的柠檬酸钠缓冲液匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液为酶液。取 500 μL 酶液中加 500 μL 0.04% 昆布多糖,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后加 1 mL DNS 沸水浴 5 min,冷却后加 5 mL 蒸馏水,测 $D_{540\text{ nm}}$ 。以在最适反应条件下(50 $^{\circ}\text{C}$)1 min 1 mL 昆布多糖产生 1 g 葡萄糖的量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与分析

2.1 西瓜幼根组织内 PAL 活性与抗病性的关系

从图 1 可以看出,不同品种卡红和苏蜜一号接种枯萎病菌后幼根组织中 PAL 活性呈不同程度的升高,并且在接种后 10 d 达到最高值。抗病品种卡红幼根组织的 PAL 活性在接种后明显高于感病品种苏蜜一号,并且在接种 1 d 就表现差异显著。

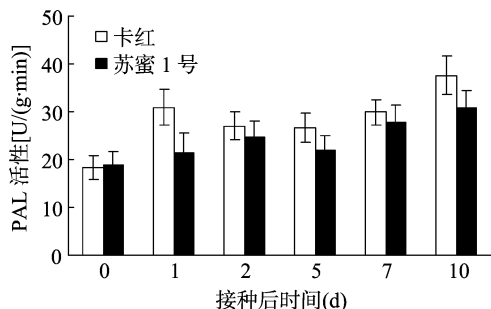


图1 接种枯萎病菌后西瓜幼根组织内 PAL 的变化

2.2 西瓜幼根组织内 PPO 活性与抗病性的关系

从图 2 可以看出,不同品种卡红和苏蜜一号接种枯萎病菌后幼根组织中 PPO 活性呈先升高后降低的趋势,且感病品种苏蜜一号幼根组织中的酶活性在 0~7 d 较抗病品种卡红高,但在接种 10 d 时,抗病品种卡红幼根组织中的 PPO 活性明显升高,并显著高于感病品种苏蜜一号。

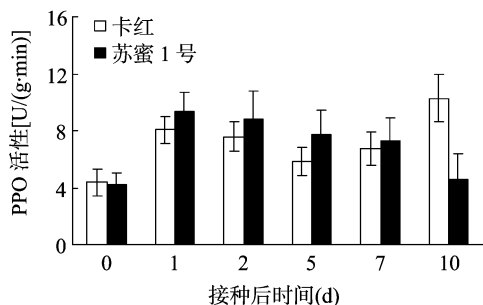


图2 接种枯萎病菌后西瓜幼根组织内 PPO 的变化

2.3 西瓜幼根组织内 POD 活性与抗病性的关系

从图 3 可以看出,抗病品种卡红接种枯萎病菌后幼根组织中的 POD 活性呈升高趋势,且在接种 10 d 时达到最高峰,而感病品种苏蜜一号接种枯萎病菌后幼根组织中的 POD 活性呈降低趋势,且在接种 10 d 达到最低值,并且在接种 10 d 时抗病品种卡红幼根组织内的 POD 活性明显高于感病品种苏蜜一号。

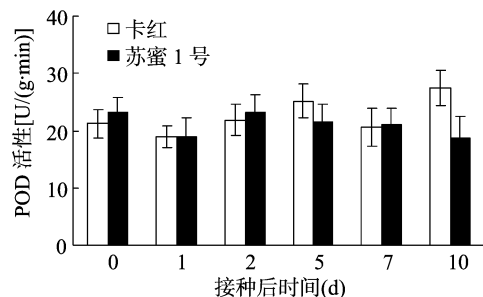


图3 接种枯萎病菌后西瓜幼根组织内 POD 的变化

2.4 西瓜幼根组织内 CAT 活性与抗病性的关系

从图 4 可以看出,抗病品种卡红接种枯萎病菌后幼根组织中 CAT 活性明显高于感病品种苏蜜一号,抗病品种卡红和感病品种苏蜜一号接种后幼根组织中的 CAT 活性都呈先升高后降低的趋势,但在接种 10 d 时,抗病品种卡红幼根组织内的酶活性较未接种时明显升高,而感病品种苏蜜一号幼根组织内的酶活性与未接种时幼根组织内的酶活性无明显差异。

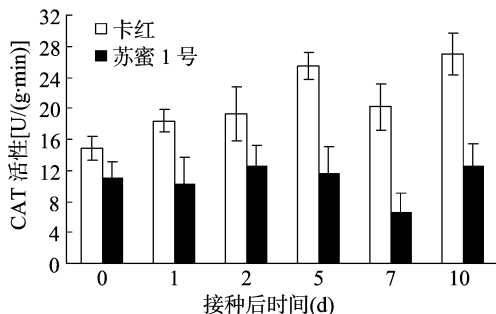


图4 接种枯萎病菌后西瓜幼根组织内 CAT 的变化

2.5 西瓜幼根组织内 CHT 的活性与抗病性的关系

从图 5 可以看出,在未接种枯萎病时,不同品种卡红和苏蜜一号幼根组织中均有较低的几丁质酶活性,且抗病品种和感病品种间的酶活性没有明显差异。接种枯萎病菌后不同品种幼根组织中 CHT 活性均呈上升趋势,抗病品种卡红幼根组织中的 CHT 活性上升速度较快,在接种后 2 d 明显高于感病品种苏蜜一号,接种后 7 d 达到最高值后开始下降。感病品种苏蜜一号幼根组织中的 CHT 活性于接种后 7 d 达到峰值,在接种后 7~10 d 感病品种苏蜜一号的 CHT 活性高于抗病品种卡红,且差异逐渐增加。

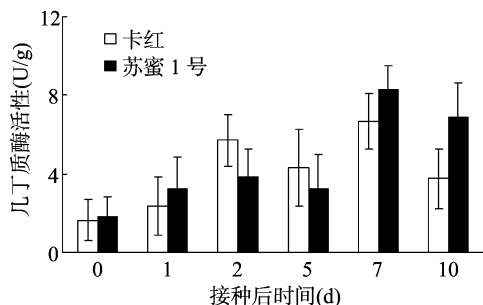


图5 接种枯萎病菌后西瓜幼根组织内 CHT 的变化

2.6 西瓜幼根组织内 GUN 活性与抗病性的关系

从图 6 可以看出,未接种枯萎病时,不同品种卡红和苏蜜一号幼根组织中 GUN 活性较高,抗病品种卡红幼根组织中的 GUN 活性高于感病品种苏蜜一号。接种枯萎病菌后,2 个品种西瓜幼根组织中的 GUN 活性呈先升高后下降的趋势,并于接种后 5 d 达到峰值。接种后抗病品种卡红幼根组织内的 GUN 活性明显高于感病品种苏蜜一号,在接种 10 d 抗病品种卡红与感病品种苏蜜一号幼根组织内的 GUN 活性差异显著。

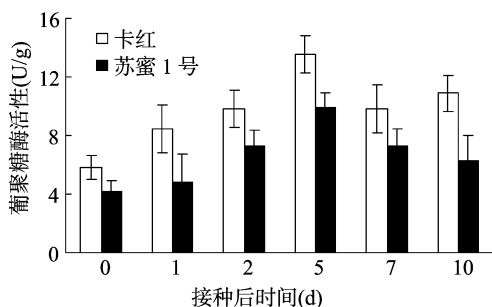


图6 接种枯萎病菌后西瓜幼根组织内GUN的变化

3 讨论与结论

国内外研究表明,植物体内多种生理代谢过程的过氧化物酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶等系列保护酶,与植物的防卫反应及抗病性密切相关,通常用作衡量植物体内防卫反应的重要指标^[9]。PAL 和 PPO 与植物体内酚类物质和木质素的形成有关,是获得系统抗性的关键调节酶^[10]。POD 和 CAT 与植物体内活性氧的清除密切相关,与植物的抗病性呈正相关^[6]。几丁质酶能分解几丁质产生 N-乙酰葡萄糖胺或几丁寡糖,这种含氮的低聚糖不仅能进一步诱导几丁质酶活性,而且具有调节植物细胞木质素代谢的功能。 β -1,3-葡聚糖酶不仅能直接作用于病原菌细胞壁,而且其作用的产物(低聚糖)可作为诱导物诱导与其他抗

病反应有关的酶系,如苯丙氨酸解氨酶、4-香豆酸-CoA 连接酶等的积累,由此促进了植保素、木质素等抗病物质的合成与积累,增强植物的抗病性^[11]。

本研究结果表明,枯萎病抗性西瓜品种卡红和感病品种苏蜜一号接种枯萎病菌后幼根组织内的 6 种酶活性都有不同程度的增加,除了几丁质酶在接种后 2 d 抗病品种幼根组织内的酶活性明显高于感病品种外,其他 5 种酶的活性都在接种后 10 d 与感病品种的酶活性差异最明显,并且在接种后 10 d 植株开始发病并且叶片处于萎蔫状态时,西瓜幼根组织内 PPO、POD、PAL、CAT 的活性都处于高峰值,从而反映了西瓜幼根组织内 PPO、POD、PAL、CAT 的活性与西瓜植株的抗病性呈正相关,而枯萎病菌从根部侵染后就在根部、茎基部产生感染,反映出根部感染影响到西瓜叶片的生理变化。

不同抗性品种接种枯萎病菌后幼根组织内的几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶均升高,反映出枯萎病菌能诱导西瓜根部组织 2 种酶活性的增强,西瓜根部的一种防卫系统加强从而抑制了病原菌的侵害。抗病品种根部组织内的酶活性比感病品种根部组织内的酶活性增加速度快,从而反映出抗病植株在受到枯萎病菌侵染后根部的防御反应比感病植株快,从而抑制了病菌的进一步入侵。但在后期抗病西瓜品种幼根组织内的几丁质酶活性比感病品种的低,其原因有待进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] 吴学宏,卢志军,王品品,等. 西瓜枯萎病综合防治研究进展[J]. 植物保护,2011,37(4):27-32.
- [2] 于丰年,朱天成. 西瓜枯萎病的发生与综合防治[J]. 现代农业科技,2010(6):177.
- [3] 徐润芳. 美国西瓜抗枯萎病育种进展[J]. 中国西瓜甜瓜,1990(2):1-5.
- [4] 许勇,王永健,葛秀春,等. 枯萎病菌诱导的结构抗性和相关酶活变化与西瓜枯萎病抗性的关系[J]. 果蔬科学,2000,17(2):125-127.
- [5] Kochuba J, Lavee S, Spiege - Rog P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamonti' orangeovular callus lines[J]. Plant Cell Physiol,1977,18:463-467.
- [6] 孙正祥,王丰,周焱. 内生菌 XG-1 对西瓜枯萎病诱导抗性的研究[J]. 河南农业科学,2013,42(3):71-75.
- [7] 史娟,李建设. 枯萎病菌诱导的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶与寄主抗病性的关系[J]. 农业科学研究,2006,27(3):24-26.
- [8] 田菲菲. 菜粉蝶提取物诱导黄瓜对炭疽病的抗性及其机理研究[D]. 保定:河北农业大学,2007:42-43.
- [9] Muthukumar A, Eswaran A, Sangeetha G. Induction of systemic resistance by mixtures of fungal and endophytic bacterial isolates against *Pythium aphanidermatum* [J]. Acta Physiologiae Plantarum,2011,33:1933-1944.
- [10] Avdiushko S A, Ye X S, Kuc J. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,1993,42:441-454.
- [11] 欧秀玲,耿雅文,李风,等. 棉花黄萎病菌病原诱导感染对转基因抗病棉花生理性状的影响[J]. 生物技术通报,2013(6):94-98.