

BTH 处理对甜瓜苗期抗蔓枯病相关 POD 和 PPO 酶活性的影响

郭勤卫,王红英,李季, Kere George Mbira, 刘佳,陈劲枫

(南京农业大学园艺学院·葫芦科作物育种与种质创新实验室 南京 210095)

摘要: 研究了 BTH 处理和蔓枯病病原菌接种对甜瓜抗蔓枯病相关的 POD 和 PPO 的影响,结果表明,BTH 处理能有效提高不同甜瓜品种对蔓枯病的抗性。BTH 处理第 1、2 和 4 天,抗蔓枯病品系‘PI420145’和蔓枯病感病品种‘伊丽莎白’的第 3 叶和第 5 叶的 POD 和 PPO 酶活性均高于对照;BTH 和蔓枯病病原共同处理第 1、3、5、7 天,‘PI420145’和‘伊丽莎白’的第 3 叶和第 5 叶的 POD 和 PPO 酶活性高于蔓枯病病原菌处理;所有的处理中‘PI420145’的 POD 和 PPO 的酶活性均高于‘伊丽莎白’。表明 POD 和 PPO 酶活性与甜瓜对蔓枯病的抗性呈正相关。

关键词: 甜瓜;蔓枯病抗性;BTH 处理;POD;PPO

Effects of BTH on Activities of POD and PPO in Resistant and Susceptible Melon Seedlings Challenged with Gummy Stem Blight

GUO Qin-wei, WANG Hong-ying, LI Ji, KERE George Mbira, LIU Jia, CHEN Jin-feng

(College of Horticulture, Laboratory of Cucurbit Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: In this study, the activities of POD and PPO in melon were analyzed after benzothiadiazole (BTH) treatment and gummy stem blight (GSB) inoculation. The results showed that the activities were enhanced in different GSB resistant melons. The activities of POD and PPO in the third and fifth leaves of PI420145 and ‘Elizabeth’ treated with BTH were higher than that of control (t -test, $P < 0.05$) on the first, second and fourth day post treatment. Similarly, the activities of POD and PPO were higher in the third and fifth leaves which were treated by both BTH and GSB inoculation than just GSB inoculation on the eighth, tenth, twelfth and fifteenth day post treatment. The POD and PPO activities were higher in PI420145 than ‘Elizabeth’ in all the situations. These results indicate that the improved resistance of GSB in melon is associated with the increased POD and PPO activities.

Key words: Melon; GSB resistance; BTH treatment; POD; PPO

甜瓜是一种世界性的蔬菜作物^[1]。蔓枯病是一种危害十分严重的土传真菌病害,在田间、温室和日光温室都有发生,能够对甜瓜的生产造成严重的经济损失^[2-7]。中国是世界首要的甜瓜生产和消费国,目前甜瓜的生产也受到蔓枯病的危害。

BTH 是一种广谱的抗真菌防护剂^[8-9],能够诱导植物产生系统获得抗性,已在烟草^[10]、棉花^[11]、小麦^[12]、水稻^[13]、西瓜^[14]、黄瓜^[15]和甜瓜^[16]等作物上广泛应用,并取得了良好的效果。

植物系统获得抗性是一种广谱的生物防护体系,能对特定的真菌和外界其他环境的刺激使植物

产生相应的抗性^[17]。其调节机制之一是对防护相关的酶活性的调节^[18]。POD 是细胞壁主要成分木质素合成途径中的一种关键酶,POD 酶活性与植物抗性相关物质的合成和植物系统性诱导抗性呈正相关^[19]。PPO 是多酚化合物氧化过程的关键酶,通常被作为细胞的氧化指标^[20]。罗婵娟等^[21]用 BTH 处理橡树古铜期叶片,发现 POD 酶活性显著高于对照,橡树对白粉病的抗性也有显著的增强。张俊华等^[22]通过测定接种 *Phytophthora capsici* 的南瓜属不同作物的 POD 和 PPO 活性,发现 POD 和 PPO 酶活性与其抗病能力紧密相关。王红英等^[23]通过测定不同抗

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1178307); 国家重点项目(30830079); 国家重点基础研究发展计划‘973’项目(2012CB113900); 国家‘863’项目(2012AA100202)

作者简介: 郭勤卫,男,硕士研究生。电话: 0570-3051851; 电子信箱: kongxinzhu0530@163.com

通讯作者: 陈劲枫,男,教授,博士生导师,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。电话: 025-84396279; 电子信箱: jfchen@njau.edu.cn

性的甜瓜,发现感病品种 PPO 酶的活性显著高于抗性品种。

本研究是在前人研究 BTH 在诱导甜瓜产生蔓枯病抗性的基础上,测定与抗病相关的氧化酶活性,明确 BTH 诱导甜瓜产生蔓枯病抗性与其抗氧化酶活性的关系,并试图说明其诱导抗性产生的生理生化机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:‘PI420145’为抗蔓枯病甜瓜自交系,由美国康乃尔大学 Molly John 教授提供;‘伊丽莎白’为感蔓枯病甜瓜品种,由新疆农业科学院哈密瓜研究中心提供。抗病和感病材料均经过本课题组多代自交。

供试菌种:蔓枯病菌为本实验室分离纯化并保存的 A 型菌株,菌株的分生孢子在仅含磷酸二氢铵的马铃薯平板培养基上,经 7 d 暗培养和 4 d 间歇紫外灯(12 h 紫外灯/12 h 黑暗)处理的光照条件下产生^[24]。

供试试剂:BTH 由日本株式会社生产,其他试剂均为国内分析级试剂。

1.2 方法

选取大小一致的甜瓜种子,温汤浸种,种植在装有蛭石、珍珠岩为 3:1 基质的营养钵中,苗期,每隔 1 d 浇 1/2-Hoagland 营养液,土壤持水量保持在 75%。

1.3 试验处理

参照代春燕等^[25]试验处理方法并稍作修改。在甜瓜 5 叶 1 心期,对第 3 叶喷施含有 50 mg·L⁻¹的

BTH 溶液,以喷施不含 BTH 的溶剂为对照,7 d 后,进行蔓枯病菌接种,蔓枯病孢子悬浮液的接种浓度为 1×10⁵ 个·mL⁻¹,并覆膜在相对湿度为 92%~95% 的条件下保湿,然后在处理后第 1、2、4、7、9、11、13 天,每个处理分别取第 3 和 5 叶作为样品,液氮保存,每重复 5 株,相同样品混合组成混样池,3 次生物学重复。

1.4 生理指标测定

参照 Muñoz-Muñoz 等^[26]测定 POD 的方法,并稍作修改。酶液提取:称取 2 g 样品液氮研磨成粉末,加入 6 mL 50 mmol·L⁻¹ 预冷的磷酸缓冲液 (pH 7.8) 在 4 ℃ 条件下,提取 20 min,转入离心管中在 4 ℃、12 000 × g 下离心 20 min,上清液即为酶粗提液。反应混合液的配制:取 50 mL PBS(pH 6.0, 0.2 mol·L⁻¹) 缓冲液于烧杯中,加入 28 μL 愈创木酚 (2-甲氧基酚)于磁力搅拌器上加热搅拌,直至溶解愈创木酚溶解,待溶液冷却后加入 19 μL 30% 的 H₂O₂,混匀后保存于冰箱中备用。参照孔祥生和易现峰^[27]测定 PPO 的方法。

2 结果与分析

2.1 BTH 和蔓枯病接种对甜瓜叶片 POD 酶活性的影响

从表 1 可以看出,经 BTH 处理后,‘伊丽莎白’和‘PI420145’第 3 叶 POD 酶活性逐渐升高,处理 4 d 后,分别为相应对照的 1.43 和 1.26 倍;经蔓枯病原菌接种处理后,‘伊丽莎白’和‘PI420145’第 3 叶 POD 酶活性同样呈上升趋势,处理 7 d 后,分别为相应接种第 1 天的 1.49 和 1.83 倍;经 BTH+蔓枯病原菌接种处理后,‘伊丽莎白’第 3 叶 POD 酶活

表 1 BTH 和蔓枯病接种对甜瓜叶片 POD 酶活性的影响

U·(g⁻¹·min⁻¹)

甜瓜品种 (系)	喷施后 时间/d	接种后 时间/d	第 3 叶				第 5 叶			
			对照	BTH 处理	接种	BTH+接种	对照	BTH 处理	接种	BTH+接种
伊丽莎白	1	0	5830.0 b	4905.0 c	*	*	4697.0 a	3536.0 b	*	*
	2	0	5974.0 a	6147.5 b	*	*	3307.0 c	3060.0 c	*	*
	4	0	5246.0 c	7526.5 a	*	*	3747.0 b	4838.0 a	*	*
	7	1	*	*	10699.0 bc	11106.5 d	*	*	10664.5 c	9808.0 d
	9	3	*	*	10517.0 c	11850.0 c	*	*	6452.5 d	11967.0 c
	11	5	*	*	10813.0 b	15775.5 b	*	*	11589.5 b	12333.0 b
	13	7	*	*	15980.0 a	26754.0 a	*	*	15694.0 a	22015.5 a
PI420145	1	0	8565.0 b	8649.5 c	*	*	3623.0 c	4895.5 c	*	*
	2	0	9236.0 a	10980.0 b	*	*	4217.0 b	5253.5 b	*	*
	4	0	9114.0 a	11465.5 a	*	*	4800.0 a	6429.0 a	*	*
	7	1	*	*	11610.0 c	11585.5 d	*	*	9946.5 d	13946.5 c
	9	3	*	*	11131.0 c	19757.5 c	*	*	10248.0 c	11492.0 d
	11	5	*	*	16750.5 b	43940.0 a	*	*	16424.0 b	34474.5 a
	13	7	*	*	21228.0 a	38031.5 b	*	*	20078.5 a	29612.5 b

[注] 表中同一栏目数据后小写字母表示 5% 差异水平。后同。

性的变化趋势与接种蔓枯病病原菌处理的变化趋势相同,处理 7 d 后,活性为 BTH+接种蔓枯病病原菌处理 1 d 后的 2.41 倍,为接种蔓枯病病原菌接种 7 d 后的 1.67 倍,‘PI420145’第 3 叶 POD 酶活性呈现先升高,处理第 5 天达到峰值,约为相应病原菌接种处理的 2.62 倍,而后下降。

经 BTH 处理后,‘伊丽莎白’第 5 叶 POD 酶活性略有下降,而后逐渐升高,处理 4 d 后,为对照的 1.29 倍,‘PI420145’第 5 叶 POD 酶活性的变化趋势和 BTH 处理第 3 叶的变化趋势相同,处理 4 d 后,为对照的 1.34 倍;经蔓枯病病原菌接种处理后和 BTH+蔓枯病病原菌接种时,‘伊丽莎白’和‘PI420145’第 5 叶 POD 酶活性的变化趋势和相应处理第 3 叶的酶活性变化趋势相同。

所有处理中,‘PI420145’第 3 和 5 叶的 POD 酶活性均高于相应处理的‘伊丽莎白’的。

2.2 BTH 和蔓枯病接种对甜瓜叶片 PPO 酶活性的影响

从表 2 可以看出,经 BTH 处理后,‘伊丽莎白’和‘PI420145’第 3 叶 PPO 酶活性略有升高;经蔓枯病病原菌接种处理后,‘伊丽莎白’第 3 叶 PPO 酶活

性先下降,而后上升趋势,处理 7 d 后,约为病原菌接种处理第 1 天的 1.81 倍,‘PI420145’第 3 叶 PPO 酶活性逐渐升高,处理 7 d 后,约为病原菌接种处理第 1 天的 1.57 倍;经 BTH+蔓枯病病原菌接种处理后,‘伊丽莎白’第 3 叶 PPO 酶活性的变化趋势与接种蔓枯病病原菌处理的变化趋势相同,处理 7 d 后,约为 BTH+接种蔓枯病病原菌处理 1 d 后的 1.26 倍,为接种蔓枯病病原菌接种 7 d 后的 1.42 倍。经 BTH+蔓枯病病原菌接种处理后,‘PI420145’第 3 叶 PPO 酶活性大体呈上升趋势,处理后 7 d,约为 BTH+蔓枯病病原菌接种处理第 1 d 的 2.5 倍,约为相应病原菌接种处理的 1.83 倍。

经 BTH 处理后,‘伊丽莎白’和‘PI420145’第 5 叶的 PPO 酶活性均逐渐升高,处理 4 d 后,分别约为相应对照的 1.35 和 1.63 倍;经蔓枯病病原菌接种处理后和 BTH+蔓枯病病原菌接种时,‘伊丽莎白’和‘PI420145’第 5 叶 PPO 酶活性变化趋势均为先升高,处理后 5 d 达到峰值,而后出现不同程度的下降。

在所有的处理中,‘PI420145’第 3 和第 5 叶的 PPO 酶活性均高于相应处理‘伊丽莎白’的。

表 2 BTH 和蔓枯病接种对甜瓜叶片 PPO 酶活性的影响

U·(g⁻¹·min⁻¹)

甜瓜品种 (系)	喷施后 时间/d	接种后 时间/d	第 3 叶				第 5 叶			
			对照	BTH 处理	接种	BTH+接种	对照	BTH 处理	接种	BTH+接种
伊丽莎白	1	0	2.084 a	2.076 b	*	*	1.639 c	1.569 c	*	*
	2	0	1.855 b	2.371 a	*	*	2.158 b	2.591 b	*	*
	4	0	1.832 b	2.353 a	*	*	2.662 a	3.583 a	*	*
	7	1	*	*	2.825 c	5.771 b	*	*	1.461 c	1.592 d
	9	3	*	*	2.582 d	5.300 d	*	*	1.905 b	2.396 c
	11	5	*	*	3.463 b	6.570 c	*	*	1.939 a	3.353 a
	13	7	*	*	5.121 a	7.278 a	*	*	0.760 d	2.696 b
PI420145	1	0	1.239 c	2.058 b	*	*	2.152 b	2.500 b	*	*
	2	0	2.292 a	2.425 b	*	*	2.225 b	2.533 b	*	*
	4	0	2.020 b	2.678 a	*	*	3.111 a	5.078 a	*	*
	7	1	*	*	4.421 c	5.094 d	*	*	2.095 b	2.688 c
	9	3	*	*	5.134 c	7.674 b	*	*	2.060 b	2.124 d
	11	5	*	*	5.972 b	7.082 c	*	*	2.860 a	4.225 a
	13	7	*	*	6.935 a	12.711 a	*	*	1.605 c	3.229 b

3 讨 论

前人研究表明,植物的抗病能力与抗病基因的有无、表达的快慢、表达的程度和表达产物的积累数量有密切的关系^[28]。本研究发现,在 BTH 处理后抗病品系‘PI40145’的 POD 和 PPO 酶活性显著高于感病品种‘伊丽莎白’,可能是由于抗病品系‘PI420145’存在抗病基因或是其抗病基因的表达速度快或表达量多于感病品种‘伊丽莎白’。

本研究证明 BTH 处理以后,‘PI40145’和‘伊丽

莎白’叶片的 POD 和 PPO 酶活性显著高于相应对照,与 BTH 处理橡胶树观察到的结果类似^[21],由此推测 POD 和 PPO 酶在 BTH 处理提高甜瓜对蔓枯病抗性的过程中起到关键性的作用。

植物系统获得性抗性能通过 SA 的积累途径,使植物对真菌病害产生抗性^[17],BTH 与 SA 的作用效果类似^[8-9],并且其保护作用能够传到整个植物体^[29],因此,这也可能是 BTH 处理甜瓜品种第 3 叶后,第 5 叶的 POD 和 PPO 酶活性也得到提高的原因。

4 结 论

BTH 通过增加 POD 和 PPO 酶活性使甜瓜获得对蔓枯病的抗性。BTH 处理能够诱导植物未处理部分产生抗性,表明其能够为整个植株提供抗病性。试验中还发现,‘PI420145’和‘伊丽莎白’的 POD 和 PPO 酶活性变化,在 BTH 和蔓枯病接种处理中有些不同,抗病品系‘PI420145’的酶活性提高程度要高于感病品种‘伊丽莎白’的。

参考文献

[1] Gomez-Guillamon M L, Moriones E, Luis-Artega M, et al. Morphological and disease resistance evaluation in Cucumis melo and its wild relatives[M]. Alexandria Va: American Society of Horticultural Science, 1998.

[2] Frantz J D, John M M. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1033-1038.

[3] Crosby K M, Miller M E, Wolff D W. Screening plant introductions of *Cucumis melo* for resistance to *Monosporascus cannonballus*[M]. Alexandria Va: American Society of Horticultural Science, 2002.

[4] McCreight J D. Reactions of 20 melon cultigens to powdery mildew race 2 U.S.[M] Alexandria Va: American Society of Horticultural Science, 2002.

[5] Wako T, Sakata Y, Sugiyama M, et al. Identification of melon accessions resistant to gummy stem blight and genetic analysis of the resistance using an efficient technique for seedling test[J]. Acta Hort, 2002, 588: 161-164.

[6] Bruton B D. Soil borne diseases in Cucurbitaceae: Pathogen virulence and host resistance[M]. Alexandria Va: American Society of Horticultural Science, 1998.

[7] Tsutsumi C Y, Silva N D. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions[J]. Braz Arch Biol Technol, 2004, 47(2): 171-177.

[8] Grolach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat[J]. Plant Cell, 1996, 8: 629-643.

[9] Kunz W, Schurter R, Maetzke T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators[J]. Pestic Sci, 1997, 50: 275-282.

[10] 王 涛, 陈泽鹏, 万树青, 等. 苯丙噻二唑(BTH)诱导烟草康青枯病活性与抗病机理研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 14: 29-32.

[11] Moshe I, Hamed D, Dan G. Induction of systemic acquired resistance in cotton by BTH has a negligible effect on phytophagous insects [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2001, 99(7): 65-70.

[12] 陈 鹏, 李振歧. BTH 诱导小麦对白粉病的抗性与几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性诱导的关系[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(7): 137-140.

[13] 宋凤鸣, 葛秀春, 郑 重, 等. 苯丙噻二唑诱发水稻对白叶枯病的系统获得抗性[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4): 323-326.

[14] 闫 涛, 彭 斌, 吴会杰, 等. BTH 诱导西瓜甜瓜抗病毒病研究

[J]. 中国瓜菜, 2009(4): 4-7.

[15] 王 莉, 黄丽丽, 康振生, 等. BTH 诱导黄瓜对霜霉病的抗性[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 274-277.

[16] 陈年来, 朱振家, 代春燕, 等. BTH 诱导不同抗性水平甜瓜抗白粉病的效应[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 764-769.

[17] Walters D R, Paterson L, Walsh D J, et al. Priming of plant defense in barley provides benefits only under high disease pressure [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2009, 73: 95-100.

[18] 毛晓英, 张玉玲, 李茂盛, 等. BTH 对新疆甜瓜抗病性的诱导研究[J]. 新疆农业科学, 2005, 42(3): 158-161.

[19] Madge Y G, Terrence L G. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* Wall Glucan[J]. Plant Physiol, 1991, 97: 1445-1455.

[20] Mayer A M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places [J]. A Review. Phytochemistry, 2006, 67: 2318 - 2331.

[21] 罗娟娟, 范志伟, 沈奕德, 等. BTH 诱导橡胶树对白粉病的抗性和相关酶活性测定[J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 475-479.

[22] 张俊华, 崔崇士. 不同抗性南瓜品种感染 *Phytophthora capsici* 病原菌后集中酶活性测定[J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(2): 124-128.

[23] 王红英, 钱春桃, 张永兵, 等. 不同抗性甜瓜接种蔓枯病菌后若干生理指标的变化[J]. 中国瓜菜, 2012, 25(1): 7-10.

[24] 李 英, 张永兵, Wolukau J N, 等. 甜瓜蔓枯病菌子实体分离及 A 型菌株产孢条件研究[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 84-88.

[25] 代春燕, 朱振家, 安翠香, 等. 诱抗剂 BTH 诱导甜瓜幼苗抗白粉病相关酶活性的研究[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(2): 286-291.

[26] Muñoz-Muñoz J L, García-Molina F, García-Ruiz P A, et al. Enzymatic and chemical oxidation of trihydroxylated phenols[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 435-444.

[27] 孔祥生, 易现峰. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 125-126.

[28] 胡景江, 刘志龙, 文建雷. 溃疡病菌低聚糖激酶诱导杨树细胞抗病机制的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(4): 146-148.

[29] 毛晓英, 吴庆志, 李学文, 等. BTH 对新疆甜瓜过氧化物酶的系统诱导作用[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(4): 31-35.

· 邮购订阅 ·

欢迎订阅 2014 年《中国果菜》

《中国果菜》杂志是全方位面向果菜产业及市场流通, 唯一立足采后贮藏、加工、包装、流通等实用技术和产销供求信息, 为果菜产销企业、专业合作社及科研教学等单位为服务重点、国内外公开发行, 多次被评为优秀科技期刊的国家级科学技术刊物。大 16 开国际标准开本, 月刊, 定价 6 元, 全年 72 元。可通过全国各地邮局订阅, 邮发代号: 24-137。也可随时向杂志社订阅。开户行: 齐鲁银行济南燕山支行; 户名: 《中国果菜》杂志社; 账号: 111311400000010775; 电话: 0531-88596737, 85118327; 传真: 0531-88932766; 电子信箱: zhggc@public.jn.sd.cn; QQ: 472046681。