

番茄抗感品种对接种枯萎菌的生理响应

裴冬丽¹, 朱晓琴¹, 徐园园¹, 李成伟²

(1. 商丘师范学院 植物与微生物互作河南省高校重点实验室, 河南 商丘 476000; 2. 河南科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要:枯萎病是番茄的主要病害之一, 严重影响了番茄的产量与品质。以感病番茄 Moneymaker 和抗病番茄 LA1221 为试验材料, 比较研究了抗、感番茄品种接种枯萎菌后 O_2^- 产生速率、丙二醛(MDA)含量以及过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化。结果表明: 抗病品种较感病品种 O_2^- 产生的速率峰值出现早且高, MDA 含量高, POD 活性升高迅速且增幅大; 抗、感品种 SOD 活性变化幅度较大, 均高于未接菌的对照。揭示了病原菌胁迫下抗、感番茄品种可能存在的调控机制, 为进一步的番茄抗性育种研究奠定基础。

关键词:番茄; 枯萎菌; 活性氧; 保护酶

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)04-0001-03

番茄是一种世界性的蔬菜作物, 也是我国的主栽蔬菜之一, 以其味美、营养丰富而在人们饮食结构中占有非常重要的地位。随着栽培面积的不断扩大, 番茄病虫害也越来越严重, 特别是在保护地栽培的番茄病虫害更为严重。番茄枯萎病就是较为严重的一种土传性病害, 严重影响番茄品质和产量。番茄枯萎病是由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)引起的一种维管束疾病。该菌主要侵染植株导管组织, 通过阻塞木质部物质和水分运输引起植株萎蔫, 严重时致死。

逆境是指对植物生存与发育不利的各种环境因素的总称, 而抗逆性是植物对逆境的抵抗和忍耐能力。植物在逆境胁迫下, 活性氧 O_2^- 生成量增加, 活性氧积累且超过伤害阈值时, 细胞膜的完整性破坏, 差别透性丧失, 电解质及某些小分子有机物大量渗漏, 发生细胞物质交换平衡打破等一系列生化代谢紊乱, 而植物体内过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化

酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等保护酶则参与清除体内氧自由基, 有效阻止高浓度氧的累积, 膜脂的过氧化, 维持植物的正常生长发育^[1-2]。

该试验研究了番茄植株在枯萎菌侵染的逆境下, 活性氧及保护酶系等各项重要生理响应(包括 O_2^- 产生速率、丙二醛(MDA)含量以及 POD、SOD 活性), 为研究番茄感病、抗病分子机理及开发番茄抗性新品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

病原菌 *F. oxysporum*、感病番茄品种 *Solanum esculentum* Moneymaker (MM)、抗病番茄品种 *S. arcanum* LA1221 均由植物与微生物互作河南省高校重点实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 接种方法 接种保存的枯萎菌于 PDA 固体培养基培养 7 d, 挑取长势好的 1 cm×1 cm 大小的菌块转接到新鲜的 PDA 液体培养基, 放入摇床培养 7~8 d(28 ℃, 100 r·min⁻¹), 培养液经灭菌的 4 层纱布过滤, 显微镜下检测孢子数目, 将菌悬浮液浓度调至 1×10⁶ 个孢子·mL⁻¹, 备用。番茄种子种植在灭菌的掺入适量有机肥料土壤中, 于 26~28 ℃人工气候室中培养, 待幼苗四叶期备用。选取株高和长势一致的番茄幼苗 MM 和 LA1221, 用刀片伤根后, 给每株幼苗定量灌注 20 mL 孢子悬浮液, 以灌注无菌水为对照, 共设 4 个处理, 每处理重复 3 次。

第一作者简介:裴冬丽(1971-), 女, 河南虞城人, 博士, 教授, 现主要从事植物分子遗传学等研究工作。E-mail: peidongli@126.com.

责任作者:李成伟(1972-), 男, 河南民权人, 博士, 教授, 现主要从事植物分子遗传学等研究工作。E-mail: lichengweiwau@hotmail.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31571997); 河南省高等学校重点科研资助项目(15A180019, 15A210045, 16A210037)。

收稿日期:2016-10-08

1.2.2 采样 分别在接种后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 后采取番茄第 3、4 片真叶,用于生理指标测定。

1.2.3 酶液提取 称取番茄幼嫩叶片 0.5 g,加入 2 mL 预冷的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.8 的磷酸缓冲液于冰浴下研磨成匀浆,再加入缓冲液冲洗研钵 2~3 次,并使最终体积为 5 mL。匀浆液于 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,上清液即为酶提取液。

1.3 项目测定

O_2^- 产生速率的测定采用羟胺氧化法^[3]。MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸法^[4]。POD 活性的测定采用愈创木酚法^[4]。SOD 活性的测定采用氮蓝四唑光化还原法^[4]。蛋白质浓度的测定根据 BRADFORD^[5] 的方法。均设 3 次重复。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行分析及作图。

2 结果与分析

2.1 接种枯萎菌后 O_2^- 产生速率的变化

从图 1 可以看出,抗病品种 LA1221 接种枯萎菌 1 d 后, O_2^- 产生速率到达峰值,是对照的 2.4 倍,随后 O_2^- 产生速率下降;感病品种 MM 接种枯萎菌 3 d 后, O_2^- 产生速率到达峰值,是对照的 2.3 倍,随后 O_2^- 产生速率下降并趋于平稳;抗病品种较感病品种 O_2^- 产生速率峰值出现早且高;抗病品种和感病品种 O_2^- 产生速率均高于未接种的对照。

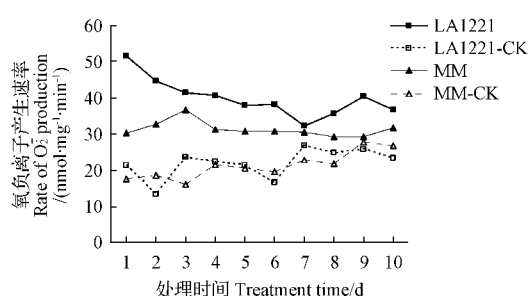


图 1 接种枯萎菌后抗、感番茄品种叶片中 O_2^- 产生速率变化

Fig. 1 Changes of O_2^- production rate in leaves of resistant and susceptible tomatoes after *Fusarium* wilt inoculation

2.2 接种枯萎菌后 MDA 含量变化

从图 2 可以看出,接种枯萎菌后抗、感番茄品种 MDA 含量均较未接种对照高;抗病品种 LA1221 的 MDA 含量于接种后 2 d 迅速增加,达到峰值,是对照的 1.8 倍;整个过程中,接菌抗病品种 LA1221 的 MDA 含量均高于感病品种 MM,接菌处理的抗、感

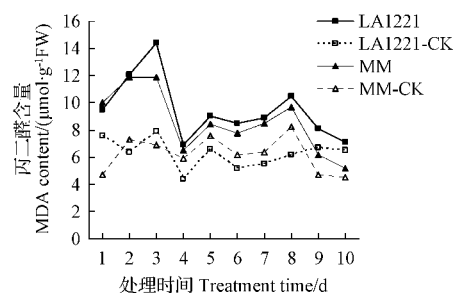


图 2 接种枯萎菌后抗、感番茄品种叶片中 MDA 含量的变化

Fig. 2 Changes of MDA content in leaves of resistant and susceptible tomatoes after *Fusarium* wilt inoculation

品种 MDA 含量高于未接菌的对照。

2.3 接种枯萎菌后番茄幼苗 POD 活性的变化

从图 3 可以看出,抗病品种 LA1221 叶片 POD 活性在接菌后迅速升高,在接种后第 2 天达到一个峰值,POD 活性为未接菌对照的 20 倍,随后活性下降;感病品种 MM 叶片 POD 活性在接菌后也出现升高,但增幅较小,接菌后第 3 天达到峰值,为未接菌的对照的 4 倍;总而言之,抗病品种接菌后 POD 活性比感病品种 POD 活性升高迅速且增幅大;接菌番茄品种 POD 活性均高于未接菌的对照组。

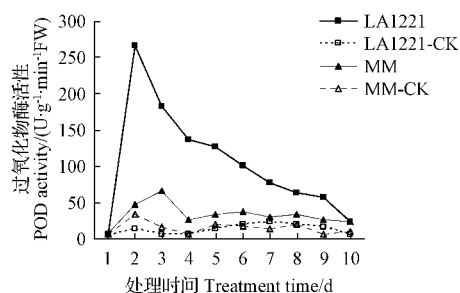


图 3 接种枯萎菌后抗、感番茄品种叶片中 POD 活性变化

Fig. 3 Changes of POD activity in leaves of resistant and susceptible tomatoes after *Fusarium* wilt inoculation

2.4 接种枯萎菌后番茄幼苗中 SOD 活性的变化

从图 4 可以看出,抗、感品种叶片不同处理组 SOD 活性出现先降再升,再降再升的趋势;接种枯萎菌的抗病品种 LA1221 在接种第 5、8 天到达峰值,SOD 活性分别是对照的 1.6、2.0 倍;接种枯萎菌的感病品种 MM 同样在接种第 5、8 天到达峰值,SOD 活性分别是对照的 2.0、1.9 倍;整个过程中接菌的抗、感品种叶片 SOD 活性均高于未接种的对照组。

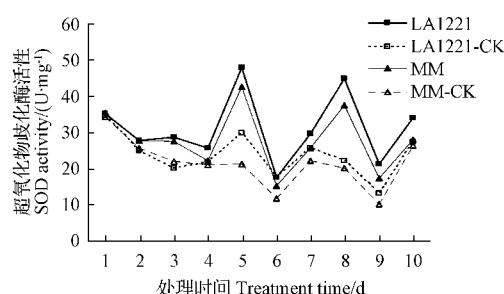


图4 接种枯萎菌后抗、感番茄品种叶片中 SOD 活性变化

Fig. 4 Changes of SOD activity in leaves of resistant and susceptible tomatoes after *Fusarium* wilt inoculation

3 讨论与结论

病原菌侵染植物后可引起植物体内积累大量的活性氧(主要是氧负离子 O_2^-),活性氧可直接攻击膜系统中的不饱和脂肪酸,导致膜脂过氧化作用的发生等,使细胞受到伤害。而在生物进化过程中,植物细胞内形成了防御活性氧毒害的保护机制,称为保护酶系统的 SOD、POD 和 CAT 等,它们在清除超氧自由基、过氧化氢和过氧化物以及阻止和减少羟基自由基形成方面起着重要作用^[6]。大量研究表明,植物的抗病性与保护酶活性的变化相关,保护酶在植物抗性反应中参与重要作用。

该试验研究了抗、感番茄品种接种枯萎菌后幼苗叶片中 O_2^- 产生速率、MDA 含量以及 POD、SOD 活性的变化等生理响应。结果表明,抗病番茄品种较感病品种的 O_2^- 产生速率峰值出现早且高。而快速的 O_2^- 的产生,被称为植物的快速过敏反应

(HR 反应),可有效阻止病原菌的侵染进程^[7];抗病番茄品种 MDA 含量于接种后 2 d 迅速增加达到峰值。MDA 是膜脂过氧化作用的产物,已有研究表明,MDA 与植物抗性反应呈正相关^[8];抗病番茄接种后 POD 活性比感病番茄 POD 活性升高迅速且增幅大,与前人研究结果一致^[9];抗、感番茄接种后 SOD 活性变化幅度较大,均高于未接菌的对照。总而言之, O_2^- 产生速率、MDA 含量以及 POD、SOD 活性与番茄植株对枯萎菌的抗性反应有一定的相关性,具体调控分子机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 宋凤鸣,郑重,葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物-病原物相互作用中的作用[J]. 植物生理学通讯,1996,32(5):377-385.
- [2] 窦俊辉,喻树迅,范术丽,等. SOD 与植物胁迫抗性[J]. 分子植物育种,2010,8(2):359-364.
- [3] 王爱国,罗光华. 植物的超氧物体自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯,1990,26(6):55-57.
- [4] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2001:195-197,258-260.
- [5] BRADFORD M M A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1976,7(72):248-254.
- [6] 翟彩霞,马春红,秦君,等. 植物诱导抗病性的常规鉴定-相关酶活性变化与诱导抗病性的关系[J]. 中国农学通报,2004,20(5):222-224.
- [7] 王晨芳,黄丽丽,张宏昌,等. 小麦-条锈菌互作过程中活性氧及保护酶系的变化研究[J]. 植物病理学报,2009,39(1):52-60.
- [8] 葛秀春,宋凤鸣,郑重. 膜脂过氧化与水稻对稻瘟病抗性的关系[J]. 浙江大学学报,2000,26(2):254-258.
- [9] 梁俊峰,李克安,谢丙炎,等. 番茄枯萎病诱导抗病性研究进展[J]. 山西农业科学,2004,32(1):52-56.

Physiological Reactions of Resistant and Susceptible Tomato Varieties After *Fusarium* Wilt Inoculation

PEI Dongli¹, ZHU Xiaoqin¹, XU Yuanyuan¹, LI Chengwei²

(1. Key Laboratory of Plant-microbe Interactions, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000; 2. Henan Institute of Science and Technology, Xinxing, Henan 453003)

Abstract: *Fusarium* wilt is one of main diseases in tomato plants, which affecting the yield and quality seriously. Susceptible tomato *Solanum esculentum* MoneyMaker (MM) and resistant *S. arcanum* LA1221 were used as materials, O_2^- production rate, MDA content and protective enzymes of POD, SOD activity after *Fusarium oxysporum* inoculation were studied. The results showed that the O_2^- production rate was produced higher and earlier, the MDA content was higher and the POD activity increased higher and more rapidly in the resistant accession than in the susceptible accession, and in both resistant and susceptible accessions SOD activity were changed widely, and higher than the controls. The regulation mechanism would be explained that the resistant and susceptible tomatoes under pathogens stresses for further study of tomato resistance breeding.

Keywords: tomato; *Fusarium* wilt; reactive oxygen species; protective enzyme