

赵丽萍, 李永灿, 赵统敏, 等. 灰霉菌毒素诱导番茄抗性突变体及相关防御酶活性[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 631-639.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.023

灰霉菌毒素诱导番茄抗性突变体及相关防御酶活性

赵丽萍¹, 李永灿¹, 赵统敏¹, 陈怀谷², 王银磊¹, 杨玛丽¹, 余文贵³, 颜志明⁴

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 3. 江苏省农业科学院, 江苏 南京 210014; 4. 江苏现代园艺工程技术中心, 江苏 句容 212400)

摘要: 以灰霉菌毒素为选择剂, 利用多步筛选法筛选番茄抗性愈伤组织突变体, 结果显示, 毒素对番茄愈伤组织的诱导、生长具有抑制作用, 且随毒素浓度的升高而增强; 获得的抗性愈伤组织在不同浓度毒素胁迫下, 其增殖率均高于原始型愈伤组织, 并在离开选择因子继代培养 2 代后, 仍保持获得的抗性。研究毒素处理后过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)的活性变化发现, 无论有无毒素胁迫, 抗性愈伤组织突变体及其再生植株的酶活性均高于原始型愈伤组织和原始植株(对照); 随着毒素胁迫浓度的增大, 抗性愈伤组织突变体及再生植株的 3 种酶活性有相同的变化趋势, 即先升高后降低, 且均比对照升高幅度大, 其中 PAL 和 PPO 酶活性的下降速度较对照慢, 说明抗性突变体通过增强与抗病性相关的酶活性, 增强植物的防卫能力。

关键词: 番茄; 灰霉病; 毒素; 离体筛选; 抗性突变体; 防御酶

中图分类号: S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0631-09

Resistant mutant induced by toxin of *Botrytis cinerea* in tomato and the activities of related defensive enzymes

ZHAO Li-ping¹, LI Yong-can¹, ZHAO Tong-min¹, CHEN Huai-gu², WANG Yin-lei¹, YANG Ma-li¹, YU Wen-gui³, YAN Zhi-ming⁴

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 4. Jiangsu Engineering and Technology Center for Modern Horticulture, Jurong 212400, China)

Abstract: Screening of resistant mutants was performed under the stress of *Botrytis cinerea* toxin by using multi-stepped positive selections in tomato. The toxin exhibited inhibition to callus induction and growth, and the inhibition was dose-dependent. The growth rate of resistant calli was higher than that of non-resistant calli under various concentrations of toxin, and the resistance was kept stable after the subculture of two generation free of selection factor. The activities of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammoniolyase (PAL) in resistant calli and regenerated

plants were higher than those in control regardless of toxin stress. As toxin concentration increased, the activities of 3 enzymes followed an "increase-decrease" trend, and the increment was larger in resistant mutants and regenerated plants, indicating that the resistant mutants improved plant defense by enhancing the activities of disease-resistant enzymes.

Key words: tomato; *Botrytis cinerea*; toxin; *in vitro* selection; resistant mutant; defensive enzyme

收稿日期: 2015-10-15

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX (12) 1004]; 基本科研业务专项 [ZX (15) 2003]

作者简介: 赵丽萍 (1981-), 女, 山东济南人, 硕士, 助理研究员, 从事番茄遗传育种研究。(Tel) 025-84390663; (E-mail) zhaoliping0123@163.com

通讯作者: 余文贵, (Tel) 025-84390003; (E-mail) wenguiyu@jaas.ac.cn

番茄灰霉病是由葡萄孢属的灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 侵染引起的一种严重病害,在番茄产区普遍流行,对产量影响很大,严重时减产40%~50%,甚至绝产^[1]。长期以来,对该病以化学防治为主,易造成病菌抗药性增强及果实农药残留等问题,种植抗病品种是解决该病害为害最根本有效的途径^[2]。虽然从1976年国内外就进行了抗病资源的筛选^[3],并取得一定的进展,为番茄抗灰霉病育种展示了良好的前景,但是叶部、茎部、果实之间抗性相关性较小或无相关性在一定程度上限制了抗源材料的有效利用^[2,4-6]。迄今为止还未有利用已有抗病材料育成抗灰霉病品种的报道。

灰霉菌能够引起寄主程序性细胞死亡^[7],具有复杂的代谢系统,可产生毒素^[8]、细胞壁降解酶、脱落酸^[9]、多糖^[10]、漆酶^[11]等多种代谢产物。而灰霉菌之所以能成功侵染植物很大程度上依赖其产生的毒素^[7]。毒素在侵染过程中起到对寄主的识别作用,同时也参与调控植物生理生化反应,影响植物超微结构,最终导致整个植株在生理、生化和形态结构上发生异常变化^[12]。同时灰霉菌毒素有很高的生物活性,不仅能从培养基中分离到,而且从受病菌感染的植物组织中也分离到^[13]。

以毒素为选择压筛选抗病突变体是迄今为止在抗病性离体筛选体系中发展比较成熟,且最为成功的一种体系^[14-15],为高效、定向提高番茄优良品种的抗病性提供了新的方法。目前中国已在小麦赤霉病^[16]、水稻纹枯病及稻曲病^[17-18]、茄子黄萎病^[15]等作物上成功筛选到抗病植株。

有研究表明灰霉菌毒素能诱导拟南芥体内与防御反应有关的酶活性变化,这些酶活性变化与寄主的抗病性有一定关系^[12]。为此,本研究利用灰霉菌毒素为选择剂,对番茄愈伤组织进行胁迫和筛选,旨在获得稳定的抗灰霉病细胞突变体及再生植株,同时研究其体内过氧化物酶(*POD*)、多酚氧化酶(*PPO*)和苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)活性的变化,以探讨其生理生化方面的抗病机制,为抗灰霉病育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

番茄灰霉菌菌株 BC-9 由江苏省农业科学院

蔬菜研究所和植物保护研究所分离、鉴定并保存。番茄材料为苏粉9号,由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 方 法

1.2.1 培养基 病原菌活化培养基(PDA培养基):马铃薯200 g+蔗糖20 g+琼脂20 g,用蒸馏水定容到1 000 ml。

病原菌产毒培养液(PD培养液):马铃薯200 g+蔗糖20 g,用蒸馏水定容到1 000 ml。

愈伤组织诱导和分化培养基(MS培养基):MS+6-BA 2.0 mg + NAA 0.2 mg +蔗糖30 g+琼脂8 g+蒸馏水1 000 ml,用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调pH至5.8。

筛选培养基:毒素溶液按一定的体积比加入到MS培养基,用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调pH至5.8。

生根培养基:MS+ NAA 0.5 mg +蔗糖30 g+琼脂8 g+蒸馏水1 000 ml,用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调pH至5.8。

1.2.2 毒素液的制备 将菌株BC-9在PDA培养基上活化培养3 d,然后用直径5 mm的打孔器打取长势均匀的菌饼12块,接种到300 ml PD培养液中,24℃下连续黑暗静置培养20 d,4层纱布过滤,除去菌丝体,滤液经4 000 r/min离心10 min后,即得到粗毒素(简称毒素)。

1.2.3 番茄无菌苗的获得 番茄种子用75%酒精消毒30 s,无菌水冲净2~3次,再用10%次氯酸钠消毒20 min,无菌水冲洗3~5次后播种于MS培养基。培养温度(25±1)℃,光照度1 600 lx,光照时间16 h/d。

1.2.4 愈伤组织的诱导 选取10 d苗龄无菌苗的下胚轴,切成长度为0.5~1.0 cm的切段,接种于MS培养基上,培养20 d,将诱导出的愈伤组织继代培养2次,逐渐变为颗粒状绿色胚性愈伤组织。培养温度(25±1)℃,光照度1 600 lx,光照时间16 h/d。

1.2.5 毒素对愈伤组织生长的影响 将在MS培养基上形成的愈伤组织切成小块转接到毒素浓度(体积比)为0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%的筛选培养基上,每处理接种15块,重复3次,20 d后观察各处理愈伤组织的生长状态,统计成活率,并在培养前后称量愈伤组织鲜质量,计算愈伤组织增殖率。

确定最大毒素选择压。

愈伤组织成活率(%)=(成活的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100%;

愈伤组织增殖率(%)=(培养后愈伤组织鲜质量-原鲜质量)/原鲜质量×100%。

1.2.6 抗性突变体的获得

1.2.6.1 抗性愈伤组织的筛选 采用多步选择法进行筛选,将在 MS 培养基上形成的愈伤组织切成小块接种到毒素浓度为 10%的筛选培养基上,20 d 后选择未褐化且明显生长的愈伤组织,转接于毒素浓度为 20%的筛选培养基上进一步继代筛选,20 d 为一个筛选周期,直至最大选择压筛选浓度。将最后筛选得到的愈伤组织转到 MS 培养基上继代 2 次,再将增殖得到的愈伤组织转接到最大选择压筛选培养基上,培养 20 d,培养温度(25±1)℃,光照度 1 600 lx,光照时间 16 h/d。

1.2.6.2 抗性愈伤组织稳定性分析 将在 MS 培养基上继代培养 2 代的抗性愈伤组织突变体和原始型愈伤组织(对照,未经处理的愈伤组织)分别转接到毒素浓度为 0、20%、40%、60%、80%的筛选培养基上培养,每处理接种大小均等的 8 块愈伤组织,重复 3 次,20 d 后统计各处理愈伤组织成活率,并计算愈伤组织增殖率,通过愈伤组织的成活率和增殖率比较抗性。

1.2.6.3 植株再生 将抗性愈伤组织接种到毒素浓度为 40%的分化培养基上,诱导不定芽的产生,待不定芽长至 2~3 cm 时,将其从基部切下,插入生根培养基中诱导生根。

1.2.7 愈伤组织的处理 将抗性愈伤组织突变体与对照愈伤组织切成均匀小块,分别浸泡在毒素浓度为 20%和 40%的溶液中,设无菌水为对照,整个过程均在无菌条件下进行。每隔 12 h 取样 1 次,每处理 4 块愈伤组织,重复 3 次。

1.2.8 植株的处理 筛选出的抗性再生植株和原始型植株(对照,未经处理的番茄植株)长至 4~5 片叶时,洗净根部,放入盛有 300 ml 毒素(浓度为 50%和 100%)的烧杯中,设无菌水为对照,置于室温下,每隔 1 d 取样 1 次,每处理 3 个植株,重复 3 次。

1.2.9 酶的测定 称适量样品置于预冷研钵中,加一定量 pH 7.8 的磷酸缓冲液(含 5 mmol/L 巯基乙醇),研磨成匀浆并用磷酸缓冲液冲洗残留部分,全部转入离心管,15 000 r/min 离心 20 min,上清液即

为酶粗提液,用于酶活性测定。

1.2.9.1 *POD* 活性测定 反应体系:2.9 ml 0.05 mol/L 磷酸缓冲液、1.0 ml 2% H₂O₂、1.0 ml 0.05 mol/L 愈创木酚和 0.1 ml 酶液,用加热煮沸的酶液为对照。反应体系加入酶液后,立即于 37 ℃ 水浴中保温 15 min,然后加入 2.0 ml 20%三氯乙酸终止反应,470 nm 波长下测定吸光度,以每分钟内吸光度变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)^[19]。

1.2.9.2 *PPO* 活性测定 反应体系:2.0 ml pH 6.0 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液,0.2 ml 酶液,1.0 ml 1.0 mmol/L 邻苯二酚溶液,对照以 1.0 ml 蒸馏水代替邻苯二酚溶液,摇匀后于 30 ℃ 水浴中保温 30 min,立即用 20%的三氯乙酸终止反应,420 nm 下测定吸光度,以每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个酶活单位(U)^[19]。

1.2.9.3 *PAL* 活性测定 酶活性测定的反应体系:1.0 ml pH 8.8 的磷酸缓冲液(含 0.02 mol/L 苯丙氨酸),0.2 ml 酶液,2.0 ml 蒸馏水,总体积 4.0 ml。用加热煮沸的酶液为对照,反应液置恒温水浴 30 ℃ 下反应 30 min,加 0.2 ml 6 mol/L HCl 终止反应,290 nm 波长下测定吸光度,以每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)^[20]。

2 结果与分析

2.1 毒素对番茄愈伤组织生长的影响

番茄愈伤组织在不含毒素的培养基上长势良好,体积迅速增大。在含有毒素的培养基上番茄愈伤组织生长受到抑制,部分或褐化死亡,或边缘开始呈灰色,变软,最后逐渐变黑死亡。由表 1 可知,随着毒素浓度的增加愈伤组织死亡率升高,当毒素浓度为 10%时,愈伤组织的存活率为 87.78%,增殖率为 114.30%,生长受到抑制小,愈伤组织可保持较新鲜的绿色,大量非抗性细胞存活;当毒素浓度为 20%时,生长进一步受到抑制,开始出现褐化,生长越来越弱,直至逐渐死亡;毒素浓度为 30%时,生长很缓慢,死亡数量逐渐增多,褐化时间提前;毒素浓度为 40%时,转接后第 6 d 部分愈伤组织呈现黄褐色,随着培养时间的延长,褐化程度越来越重最终逐渐死亡,但在它们边缘有一些绿色、瘤状、致密的细胞体长出。当毒素浓度为 50%~60%时,生长基本停滞,褐化时间提前至转接后第 2~4 d,至观察时大部分愈伤组织呈现黑色,基本已全部死亡。这说明

在利用毒素筛选细胞无性系的过程中,毒素浓度过大和过小都影响筛选效果。从毒素浓度和愈伤组织成活率(表1)可以看出,毒素浓度为40%时,愈伤组织死亡约50%,即番茄愈伤组织毒素浓度的半致死量为40%,结合愈伤组织在各浓度下的生长状态,确定毒素浓度40%为灰霉病抗性突变体的最大筛选压。

表1 不同浓度毒素对番茄愈伤组织生长的影响

Table 1 Effect of different concentrations of toxin on tomato calli growth

粗毒素浓度(%)	愈伤组织成活率(%)	愈伤组织增殖率(%)
0	100.00	145.73A
10	87.78	114.30B
20	74.44	91.34C
30	61.11	70.64D
40	45.56	43.26E
50	17.78	14.76F
60	3.33	1.22G

同一列数据后不同大写字母表示在0.01水平差异显著。

2.2 抗性愈伤组织突变体的筛选

采用多步正选择法筛选抗灰霉病细胞突变体,随毒素浓度增大,愈伤组织的成活率及增殖率呈下降趋势(表2)。在毒素浓度为10%时,愈伤组织生长速度较快,生长状态较好,为浅绿色,疏松状;挑选长势良好的愈伤组织转到浓度为20%的筛选培养基上,部分愈伤组织边缘变软,但成活率较高,愈伤组织生长速度尽管有所下降,但仍然较快,与10%毒素浓度时的生长速度相比,差异达到显著,但未达到极显著;挑选存活的愈伤组织转到毒素浓度为30%的培养基上,生长速度下降更快,愈伤组织增殖率与20%浓度相比,达到极显著差异;挑选存活的愈伤组织转接到毒素浓度为40%的培养基上,愈伤组织缓慢生长,说明经逐步筛选得到的愈伤组织具有一定的抗性。由此还可以看出,当粗毒素浓度 \leq 20%时,毒素对愈伤组织生长的抑制较小,当浓度 $>$ 20%时,毒素对愈伤组织生长的抑制效应明显加强。最后将筛选出的60块生长状态良好的愈伤组织在MS培养基上进行增殖培养2次,再将增殖得到的愈伤组织转接到毒素浓度为40%的筛选培养基上,去除生理性适应细胞,这样获得的愈伤组织认为是抗性愈伤组织突变体。

表2 多步正选择法筛选番茄抗性愈伤组织突变体过程中愈伤组织的生长情况

Table 2 Effects of toxin concentration on the growth of tomato calli by multiple-stepped positive selection

粗毒素浓度(%)	愈伤组织成活率(%)	愈伤组织增殖率(%)
0	100.00	138.42aA
10	90.78	119.24bB
20	86.75	113.80cB
30	75.97	89.14dC
40	65.54	60.50hE
0	84.42	74.84cC
0	87.31	83.21fD
40	69.24	68.61gD

同一列数据后不同大、小写字母分别表示差异达0.01和0.05显著水平。

2.3 抗性愈伤组织突变体稳定性分析

抗性愈伤组织突变体和原始型愈伤组织随着毒素浓度的增大,成活率和增殖率逐渐下降(表3)。在MS培养基上培养时,抗性愈伤组织突变体和对照存活率都保持较高水平,不存在明显差异,但是抗性愈伤组织由于毒素长期作用,生长缓慢,增殖率较对照低。抗性愈伤组织在毒素浓度为20%、40%、60%时,增殖率分别为对照的1.06、1.84和14.32倍。当毒素浓度为60%时,对照几乎停止生长,而抗性愈伤组织增殖率为25.64%;当毒素浓度为80%时,对照全部死亡,而抗性愈伤组织仍然有8.33%的成活率,并很缓慢地生长,增殖率为4.32%。说明经毒素连续筛选得到的抗性细胞变异体对番茄灰霉菌毒素具有一定的抗性,在无毒素培养基上继代2次抗性仍存在,细胞系的抗性相对稳定。

2.4 毒素对愈伤组织酶活性的影响

2.4.1 *POD* 活性 如图1所示,毒素处理前,抗性愈伤组织与原始型愈伤组织*POD*活性相差不大,毒素处理后愈伤组织*POD*发生明显变化,随着毒素处理时间的延长均呈先升后降的趋势。20%毒素液处理后,*POD*活性均上升,而抗性愈伤组织活性高于原始型愈伤组织,且活性峰值均出现在处理后24h,原始型愈伤组织*POD*活性峰值为401.33 U/(g·min),抗性愈伤组织突变体活性峰值为445.33 U/(g·min),之后活性迅速下降;40%毒素液处理后,愈伤组织*POD*活性变化与20%毒素液处

表3 番茄抗性愈伤组织稳定性分析

Table 3 Stability of resistant tomato calli

愈伤组织类型	毒素浓度 (%)	愈伤组织存活率 (%)	愈伤组织增殖率 (%)
抗性愈伤组织	0	91.67	88.64A
	20	87.50	84.32A
	40	83.33	77.85B
	60	29.17	25.64C
	80	8.33	4.32D
原始型愈伤组织 (对照)	0	100.00	127.20A
	20	75.00	79.42B
	40	41.67	42.34C
	60	4.17	1.79D
	80	0	0D

同一列数据后不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。

理基本一致,只是原始型愈伤组织活性峰值为 441.00 U/(g·min),抗性愈伤组织突变体 POD 活性峰值为 492.00 U/(g·min),均大于 20% 毒素处理愈伤组织 POD 活性峰值。在整个毒素处理时间内抗性愈伤组织突变体 POD 活性均高于原始型愈伤组织,说明毒素可诱导愈伤组织 POD 活性,抗性愈伤组织突变体上升幅度较大。高浓度毒素诱导愈伤组织 POD 活性效果更好。

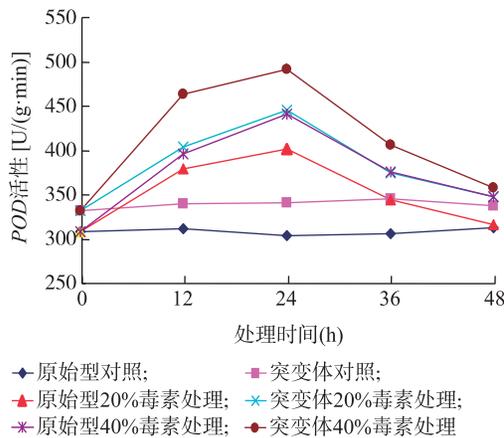


图1 毒素处理后番茄突变体和原始型愈伤组织 POD 活性的变化

Fig.1 Changes of POD activities in resistant mutant and original calli of tomato after toxin treatment

2.4.2 PPO 活性 如图 2 所示,毒素处理前,抗性愈伤组织突变体 PPO 活性略大于原始型愈伤组织。

毒素处理后,抗性愈伤组织 PPO 活性快速上升,明显高于原始型。其中 20% 毒素液处理后,愈伤组织于 24 h 左右达到 PPO 活性高峰,原始型愈伤组织活性峰值为 93.67 U/(g·min),抗性愈伤组织突变体活性峰值为 106.33 U/(g·min);40% 毒素液处理后,愈伤组织 PPO 活性分别于毒素处理 12 h 和 36 h 左右达到活性高峰,第 1 个活性峰值大于第 2 个峰值,抗性愈伤组织上升幅度大于原始型愈伤组织。对照处理 PPO 活性相对比较稳定,没有明显的变化。在毒素处理期间抗性愈伤组织突变体 PPO 活性均高于原始型愈伤组织,说明毒素可诱导愈伤组织 PPO 活性,抗性愈伤组织上升幅度较大。高浓度毒素诱导愈伤组织 PPO 活性效果更好。

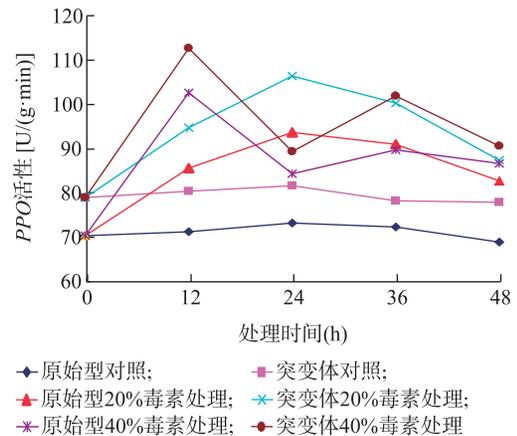


图2 毒素处理后番茄抗性突变体和原始型愈伤组织 PPO 活性的变化

Fig.2 Changes of PPO activities in resistant mutant and original calli of tomato after toxin treatment

2.4.3 PAL 活性 毒素处理后愈伤组织 PAL 活性呈现先升高后下降的趋势(图 3),其中,20% 毒素液处理后,抗性愈伤组织突变体内 PAL 于处理 24 h 后出现活性高峰,为 101 U/(g·min),原始型愈伤组织于处理 36 h 后出现活性高峰为 86.33 U/(g·min),即抗性愈伤组织内 PAL 活性峰值出现的时间早且升高幅度大。40% 毒素液处理后,愈伤组织于处理后 24 h 左右出现 PAL 活性高峰,抗性愈伤组织 PAL 活性峰值为 108.33 U/(g·min),原始型愈伤组织活性峰值为 93.00 U/(g·min),40% 毒素液处理的抗性愈伤组织突变体 PAL 活性峰值高于原始型愈伤组织,均高于经 20% 毒素液处理后活性峰值。对照 PAL 活性相对比较稳定,没有明显的

变化。抗性愈伤组织 *PAL* 活性均大于原始型愈伤组织,说明毒素可诱导愈伤组织 *PAL* 活性,抗性愈伤组织上升幅度较大。高浓度毒素诱导愈伤组织 *PAL* 活性效果更好。

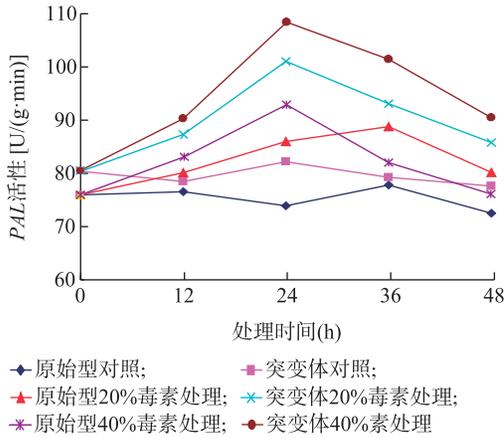


图3 毒素处理后番茄突变体和原始型愈伤组织 *PAL* 活性的变化

Fig.3 Changes of *PAL* activities in mutant and original calli of tomato after toxin treatment

2.5 毒素对番茄植株酶活性的影响

2.5.1 *POD* 活性 由图4可以看出,毒素处理前植株 *POD* 活性差异不大,处理后,植株 *POD* 活性具有相同的变化趋势,即先升高后下降。其中,50%毒素液处理后,植株于2 d后达到活性高峰,抗性再生植株 *POD* 活性峰值为 470.67 U/(g·min),原始植株 *POD* 活性峰值为 412.00 U/(g·min),抗性再生植株 *POD* 活性增加幅度大于原始植株;100%毒素液处理后,原始植株 *POD* 活性于1 d左右达到活性高峰,*POD* 活性峰值为 388.00 U/(g·min),低于50%毒素处理后原始植株 *POD* 活性峰值,抗性再生植株 *POD* 活性迅速升高于2 d左右达到峰值[489.33 U/(g·min)],增加幅度高于50%毒素液处理后抗性植株 *POD* 活性峰值;随着处理时间的延长,*POD* 活性没有显著差异。说明毒素可诱导植株体内 *POD* 活性增加,抗性再生植株增加幅度较大。

2.5.2 *PPO* 活性 由图5可以看出,处理前植株 *PPO* 活性差异不大,处理后,植株 *PPO* 活性升高,其中,抗性再生植株经50%毒素液处理3 d内植株 *PPO* 活性一直增加,活性峰值为 97.00 U/(g·min),原始植株在2 d左右 *PPO* 活性达到峰值,为 89.00 U/(g·min),升高幅度小于抗性植株;

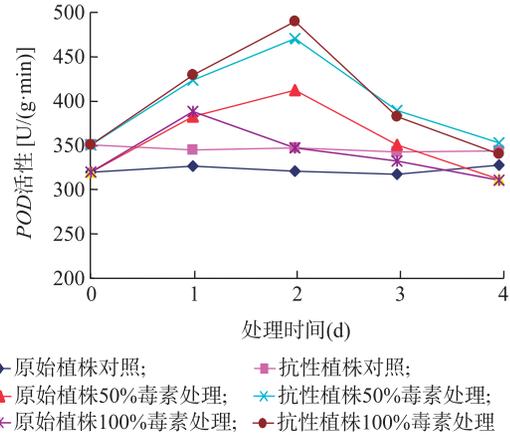


图4 毒素处理后番茄植株 *POD* 活性的变化

Fig.4 Changes of *POD* activity in tomato plant after treated by toxin

100%毒素液处理后,植株 *PPO* 活性于2 d左右达到高峰,增加的幅度稍大于50%毒素液处理后植株 *PPO* 活性。表明,植株经毒素处理后,植株 *PPO* 活性增加,抗性再生植株 *PPO* 活性增加幅度较大;高浓度毒素对植株 *PPO* 活性诱导效果更好。

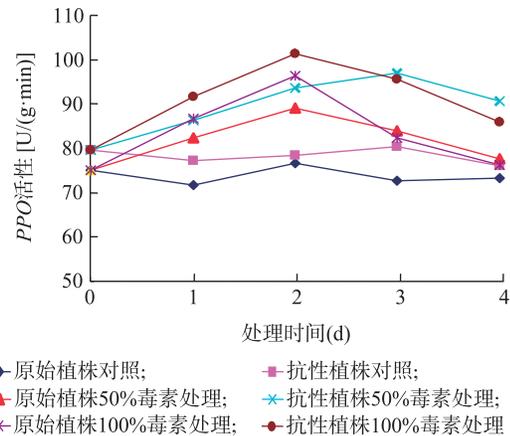


图5 毒素处理后番茄植株 *PPO* 活性的变化

Fig.5 Changes of *PPO* activities in tomato plant after toxin treatment

2.5.3 *PAL* 活性 由图6可知毒素处理前植株 *PAL* 活性差异不大,不同浓度毒素处理后,植株 *PAL* 活性先升高再下降,且在整个测定期内均高于对照。其中50%毒素液处理后植株于2 d左右达到活性高峰,抗性再生植株 *PAL* 活性峰值为 95.33 U/(g·min),原始植株 *PAL* 活性峰值为 92.33 U/(g·min),升高幅度低于突变植株 *PAL* 活性;

100%毒素液处理 2 d 后达到植株 PAL 酶活性高峰,原始植株 PAL 活性峰值为 94.33 U/(g·min),抗性植株 PAL 酶活性峰值为 103.67 U/(g·min),升高幅度大于 50%毒素液处理植株 PAL 活性。说明,毒素可诱导幼苗体内 PAL 活性增加,抗性植株增加幅度较大;高浓度诱导植株 PAL 活性效果更好。

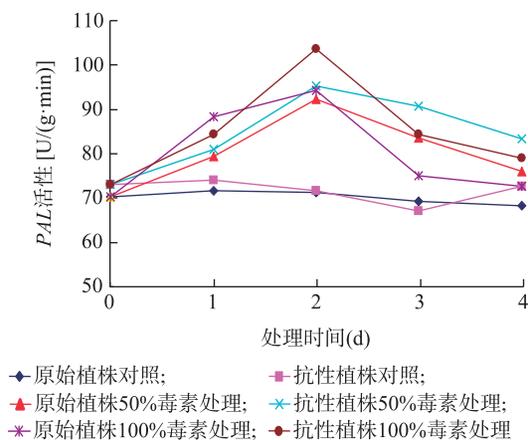


图6 毒素处理后番茄植株 PAL 活性的变化

Fig. 6 Changes of PAL activities in tomato plant after toxin treatment

3 讨论

在植物离体培养形成再生植株的过程中,易发生细胞变异,而且变异频率远远高于自然突变,再加上毒素的胁迫作用,极易产生抗病突变体^[12,21]。因此,本试验直接将愈伤组织接种于毒素选择培养基上,而未对原始材料进行其他诱变处理。

目前毒素适宜剂量和选择次数因毒素致病强弱不同、待筛选的愈伤组织自身抗性不同尚无统一标准。李大伟等^[22]综合考虑粗毒素对辣椒种子、幼苗、胚根以及愈伤组织的抑制作用,认为粗毒素浓度 0.60 g/L 为辣椒抗枯萎病体细胞变异无性系筛选适宜剂量。吴志凤等^[23]认为在筛选过程中愈伤组织存活率为 5% 时的毒素浓度最佳。赵明敏等^[15]认为愈伤组织诱导率为 27.28% 时的毒素浓度 (15.0%) 可作为抗毒素突变体的筛选压力。本试验发现灰霉菌毒素对愈伤组织的诱导、生长有明显的抑制作用,且抑制作用随毒素浓度的增大而增强。当毒素浓度为 40% 时,对愈伤组织生长既有一定的抑制,又不会使愈伤细胞全部死亡,且保持一定的分化率,试验从多方面考虑,选择逐步增加毒素浓度的

多步筛选法,确定毒素浓度 40% 为灰霉菌抗性突变体的最大筛选压。

细胞在离体筛选过程中得到的变异系可能是基因发生突变,这种突变是可遗传的;也可能是细胞生理适应性的结果,这些变异会随着选择因素的消失而消失,恢复到对毒素敏感状态,因而需对筛选得到的抗性变异体进行稳定性鉴定。只有经过无毒素培养几代后再转接到含毒素培养基能够继续正常生长的愈伤组织,其抗性才被认为是稳定的。有研究表明,在一定浓度的选择压下连续选择数 10 代的组织或细胞,转入无选择压的培养基中继代数次后,抗性细胞变异体的抗性消失,说明这是生理适应,而不是遗传的变异^[24-25]。以枸杞炭疽病毒毒素诱导抗性愈伤组织变异体所得到的变异系在不含毒素培养基上继代培养 4 代后,转接到 50% 毒素浓度下,相对生长量持续上升,说明获得的抗性愈伤组织变异系对枸杞炭疽病菌病原菌粗毒素的抗性是相对稳定的^[25]。本试验将筛选得到的愈伤组织在无毒素培养基上继代 2 次又转接到毒素浓度为 60% 的培养基上,发现其存活率明显大于对照,增殖率持续增加,而对照增殖率只有 1.79%,几乎停止生长,因此认为经毒素处理多步筛选获得的抗性细胞突变体对灰霉菌毒素的抗性是稳定的。

正常状态下,植物体内活性氧代谢处于低水平动态平衡之中。植物受到伤害,最先引发体内活性氧的增加,POD 与 SOD、CAT 协同作用清除活性氧^[26-27]。植物的抗病反应还涉及一系列复杂的生理生化变化,当受到伤害时,诱导合成次生代谢产物如木质素、植保素、酚类和醌类等抗性物质,从而阻止伤害的侵染和扩展。POD 不仅能调节植物体内活性氧含量,而且参与木质素前体物质的聚合作用,并能抑制病原物水解酶的作用^[28]。PAL 是苯丙烷类代谢的关键酶,参与木质素、植保素等一些次生物质的合成^[28],使木质素大量合成并沉积于细胞壁间,将伤害限制在一定范围内或将毒素钝化等。PPO 能将酚类物质氧化为醌,钝化病原菌产生的胞外毒素及相关酶类,阻止病原菌进一步侵入,同时也参与木质素的合成^[28-29]。近年来也有许多研究结果证明毒素处理后酶活性与植株的抗性有一定的关系,抗性品种的 PAL、PPO 和 POD 酶活性高于感病品种^[30-32],因此这 3 种酶常用作鉴定植株抗病性的生化指标。

本试验结果表明毒素处理愈伤组织后, *POD*、*PAL*、*PPO* 活性呈现相似的变化趋势, 即先升高再下降, 只是酶活性峰值大小和出现的时间不同, 而酶活性之所以会先升高再下降, 可能是因为随着毒素处理时间的延长, 细胞内活性氧积累过多, 造成膜脂过氧化, 破坏质膜透性, 使细胞分解, 当毒素对细胞的伤害程度超过了自身的防御能力时, 防御性酶活性则开始降低。毒素处理后, 供试材料受到了伤害, 致使活性氧增加, 此时 *POD* 明显上升, 用来清除产生的活性氧, *PAL*、*PPO* 酶也升高, 增加抑制物质的合成, 这 3 种酶共同作用以减少毒素的伤害。毒素处理数小时后愈伤组织达到活性峰值, 而植株在数天后达到活性峰值, 说明愈伤组织对毒素反应更灵敏。同一毒素浓度处理下, 抗性愈伤组织及再生植株的 3 种酶活性比对照愈伤组织及再生植株的酶活性升高幅度大, 且 *PAL*、*PPO* 下降速度比对照缓慢, 酶活性持续时间长, 更有利于抗性物质的合成, 抗性更强。试验结果与敖世恩等^[16] 研究结果相似。因此试验认为这 3 种酶活性与番茄对灰霉病的抗性呈一定的正相关。此外本试验还发现毒素浓度越大, 酶活性上升越明显, 说明高浓度更易诱导酶活性。但韩珊等^[33] 报道当用低于 100 g/ml 栗疫菌 Cp-毒素处理板栗叶片时, 保护性酶活性升高, 当毒素浓度高达到 200 g/ml 时, 酶活性明显下降。因此, 在利用毒素进行离体筛选时, 有必要进行毒素浓度的筛选, 在一定的毒素范围内, 有利于抗性细胞系的筛选, 毒素过高, 可能会造成细胞的全部死亡, 反而不利于筛选。

参考文献:

- [1] 顾丽嫔. 壳寡糖对番茄灰霉病菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 115-117.
- [2] 赵统敏, 余文贵, 赵丽萍, 等. 番茄抗灰霉病育种研究进展[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1141-1147.
- [3] FARLEY J D, GEORGE W L. Resistance to *Botrytis cinerea* [J]. Tomato Genetics Cooperative Report, 1976, 26: 7.
- [4] NICOT P C, MORETTI A, ROMITI C, et al. Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions [J]. Tomato Genetics Cooperative Report, 2002, 52: 24-26.
- [5] EGASHIRA H, KUWASHIMA A, ISHIGURO H, et al. Screening of wild accessions resistance to gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) in *Lycopersicon* [J]. Acta Physiology Plant, 2000, 22: 324-326.
- [6] TEN HAVE A, VAN BERLOO R, LINDHOUT P, et al. Partial stem and leaf resistance against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in wild relatives of tomato [J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 117: 153-166.
- [7] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease [J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(5): 1-20.
- [8] COLLADO I G, CANTORAL J M, GALÁN R H, et al. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea* [J]. Phytochemistry, 1995, 38: 647-650.
- [9] MARUMO S, KATAYAMA M, KOMORI E, et al. Microbial production of abscisic acid by *Botrytis cinerea* [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1982, 46(7): 1967-1968.
- [10] CUTLER H G, JACYNO J M, HARWOOD J S, et al. Botcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea* [J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1993, 57(11): 1980-1982.
- [11] MOYAHEDI S, HEALE J B. The role of aspartic proteinase and endo-pectinlyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1990, 36: 303-324.
- [12] 杨红玉, 夏绍螺, 吴嘉, 等. 一氧化氮对拟南芥抗灰葡萄孢菌分泌的大分子毒素毒性的影响 [J]. 西南农业学报, 2013, 26(4): 1503-1506.
- [13] DURÁN R, CORRALES E, HERNÁNDEZ-GALÁN R, et al. Bio-transformation of caryophyllene oxide by *Botrytis cinerea* [J]. Journal of Natural Products, 1999, 62: 41-44.
- [14] 赵蕾, 梁元存, 张天宇. 利用致病毒素筛选植物抗病突变体的研究进展 [J]. 生物技术, 2001, 11(3): 41-43.
- [15] 赵明敏, 刘正坪, 霍秀文. 利用病原真菌毒素离体筛选茄子抗黄萎病突变体的研究 [J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 92-95.
- [16] 张小红. 小麦抗赤霉突变体离体筛选及其抗性机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [17] 敖世恩, 杨媚, 周而勋, 等. 离体筛选的水稻抗纹枯病突变体的生理生化特性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(2): 39-41.
- [18] 马慧, 张丽, 钟鸣, 等. 运用致病毒素筛选抗稻曲病突变体的研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16): 4746-4747.
- [19] 李合生, 李琳, 焦新之. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [20] 薛应龙. 植物生理实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [21] IRVINE J E. The frequency of marker changes in sugarane plants regenerated from callus culture [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1984, 3: 201-209.
- [22] 李大伟, 黄炜, 巩振辉. 辣椒抗枯萎病体细胞变异无性系筛选粗毒素适宜剂量的研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(6): 130-134.
- [23] 吴志凤, 王裕中. 利用禾谷镰刀菌粗毒素筛选抗小麦赤霉病突变体 [J]. 江苏农学院学报, 1994, 15(1): 35-39.
- [24] HARTMAN C L, MCCOY T J, KNOUS TR, et al. Selection of al-

- falfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin (s) produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis*[J]. *Plant Science Letter*,1984,84(1): 183-194.
- [25] 曲玲,焦恩宁,李彦龙,等.枸杞抗炭疽病菌毒素愈伤组织变异体的离体筛选及其防御酶活性研究[J].西北林学院学报,2015,30(3):81-88.
- [26] KEPPLER L D, BAKER C J. O₂ initiated lipid peroxidation in abacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions[J]. *Phytopathology*, 1989, 79:555-559.
- [27] 陶宗娅,田小凤,向述莲,等.赤霉菌粗毒素对小麦幼苗活性氧代谢的影响[J].西南农业大学学报,2005,27(6):851-856.
- [28] 高芬,褚建梅,李静虹,等.植物病原真菌致病机理研究进展[J].江苏农业学报,2014,30(5):1174-1179.
- [29] 张树生,胡蕾,刘忠良,等.植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J].安徽农学通报,2006,12(13):48-49.
- [30] 刘慧芹,刘慧平,韩巨才.抗、感品种 PAL 叶霉菌粗毒素对番茄幼苗防御酶及活性氧的诱导[J].华北农学报,2009,24(6):215-218.
- [31] 台莲梅,许艳丽,闰凤云.尖孢镰孢菌毒素对大豆防御酶系活性的影Ⅱ[J].中国油料作物学报,2008,30(2):249-251.
- [32] 薛春生,肖淑芹,韩洪强.灰斑病菌毒素对玉米植株防御酶系活性的影响及诱导抗性作用[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(9):175-180.
- [33] 韩珊,朱天辉.不同抗性板栗品种的防御酶系对栗疫菌 Cp-毒素的响应[J].植物保护学报,2009,36(4):305-309.

(责任编辑:陈海霞)