

香蕉与枯萎病菌4号小种互作过程中 防御酶活性的变化

曾蕊^{1,2} 陈琦光² 禄璐² 唐倩菲² 周而勋²

1. 上海农林职业技术学院园艺园林系, 上海 201600; 2. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 为探讨香蕉被枯萎病菌4号小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4) 侵染后防御酶活性的变化规律, 采用伤根浸孢子液接种法, 对粉蕉(ABB)和巴西蕉(AAA)的香蕉苗进行人工接种试验, 测定香蕉苗与枯萎病菌互作过程中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)5种防御酶的活性变化。结果表明: 接种的香蕉苗体内 PAL、POD、PPO 和 SOD 酶活性都高于未接种的对照香蕉苗, 且各种酶活性变化也比未接种的变化复杂, 表明这4种酶在枯萎病菌侵染过程中积极参与了香蕉苗体内的抗病反应; 但接种与未接种的香蕉苗体内 CAT 活性变化大致相似, 表明 CAT 活性的变化与枯萎病菌的侵染无关。

关键词 香蕉; 香蕉枯萎病菌; 寄主-病原菌互作; 防御酶

中图分类号 S 432.4⁺4; S 668.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0061-04

由尖镰孢古巴专化型[*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder et Hansen]引起的香蕉枯萎病, 是国际植物病害检疫对象, 也是中国广东省和福建省补充的植物检疫对象^[1], 是香蕉产区最严重的毁灭性病害之一。对于香蕉枯萎病的防治, 目前采取的防治措施主要是加强检疫、培育抗病品种和生产无病组培苗等。过去对香蕉枯萎病的研究主要集中在病原菌的形态学、专化型、生理小种、遗传多样性以及病害发生流行和防治等方面^[2-3], 而对香蕉与枯萎病菌互作过程中生理生化的变化等研究较少。

近年来, 笔者所在课题组对香蕉与枯萎病菌互作过程中内源激素和酚类物质含量的变化、香蕉枯萎病菌毒素以及香蕉抗枯萎病突变体的筛选等进行了一些试验与研究^[4-6]。在前人研究工作的基础上, 笔者采用粉蕉(ABB)和巴西蕉(AAA)的香蕉苗为试材, 观察香蕉被枯萎病菌侵染后植株体内5种防御酶活性的变化, 分析防御酶与枯萎病菌侵染诱导的关系, 旨在揭示香蕉抗枯萎病的生理生化机理, 为进一步研究相关生化因子在香蕉抗枯萎病中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株: 香蕉枯萎病菌4号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *Foc* 4) Z7 菌株(寄主品种 Cavendish AAA), 为华南农业大学真菌研究室从广东省广州市番禺香蕉产区采集、分离、鉴定和保存的菌株。

香蕉种类(组培苗): 粉蕉(ABB)和巴西蕉(AAA), 购自广东省农业科学院果树研究所。将4~5片叶的香蕉苗种植于黑色塑料杯中, 每个杯种1株, 置于温室下培养, 供接种时使用。

1.2 接种体的制备

将 *Foc* 4 Z7 菌株接种在 PDA 培养基上, 25 °C 下恒温培养 10 d, 用无菌水冲洗孢子, 并配制成浓度为 5×10^5 个/mL 的孢子悬浮液, 供接种时使用。

1.3 接种方法

参照胡适连等^[7]的方法, 采用伤根浸孢子液方法进行接种, 对照用无菌水。每处理 10 株苗, 重复 3 次。分别于接种后 7、14、21、28、35 d 采样(假茎), 用于酶活性测定。

收稿日期: 2013-04-16

基金项目: 国家现代农业(香蕉)产业技术体系建设专项(nycytx-33-06, CARS-32)

曾蕊, 硕士, 助教. 研究方向: 植物病理学与真菌学. E-mail: zengr@shafc.edu.cn

通信作者: 周而勋, 博士, 教授. 研究方向: 植物病理学与真菌学. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

1.4 酶活性的测定

1) 苯丙氨酸解氨酶(PAL)。参照李合生^[8]的方法,从假茎组织提取粗酶液,4℃下保存备用。反应体系:0.02 mol/L的L-苯丙氨酸0.5 mL,蒸馏水1 mL,酶液0.5 mL,共2 mL;对照加0.5 mL蒸馏水。反应液在30℃水浴中反应30 min后测定 D_{290} 。以每分钟 D_{290} 变化值为1个酶活单位(U_1)。

2) 过氧化物酶(POD)。参照朱广廉等^[9]和徐海涛^[10]的方法,从香蕉苗假茎组织中提取粗酶液。在试管中加入2.98 mL含18 mmol/L愈创木酚的磷酸缓冲液(0.05 mol/L,pH 5.8)和10 μ L酶液,再加入10 μ L 0.1%的 H_2O_2 起始反应,对照加相同体积的缓冲液。以每分钟 D_{470} 变化值为1个酶活单位(U_2)。

3) 多酚氧化酶(PPO)。参照朱广廉等^[9]和徐海涛^[10]的方法,从香蕉苗假茎组织中提取粗酶液。反应体系:0.05 mol/L、pH 5.8磷酸缓冲液3.9 mL,0.1 mol/L儿茶酚1 mL,酶液0.1 mL,共5 mL;对照用磷酸缓冲液代替酶液。反应体系中加入酶液后立即于37℃保温10 min,保温后迅速放入冰浴,立即加入2 mL 20%的TCA(三醋酸纤维素),测定 D_{525} 值。以每分钟 D_{525} 变化值为1个酶活单位(U_3)。

4) 超氧化物歧化酶(SOD)。参照李合生^[8]的方法,从香蕉苗假茎组织提取粗酶液。反应体系:0.05 mol/L、pH 7.8磷酸缓冲液1.5 mL,130 mmol/L蛋氨酸溶液0.3 mL,750 μ mol/L NBT(氯化硝基四氮唑蓝)溶液0.3 mL,100 μ mol/L EDTA- Na_2 液0.3 mL,20 μ mol/L核黄素0.3 mL,酶液0.05 mL,蒸馏水0.25 mL,总体积3.0 mL;其中2支对照试管以缓冲液代替酶液。混匀后将1支对照试管置于暗处,其他各试管置于4 000 lx日光下反应30 min,并保持各试管受光情况一致。反应结束后,以不照光的对照试管作空白调零,分别测定其他各试管的 D_{560} 值。以抑制50% NBT(氯化硝基四氮唑蓝)光化还原的酶量定为1个酶活单位(U_4)。

5) 过氧化氢酶(CAT)。参照曾永三^[11]的方法,从香蕉苗假茎组织提取粗酶液,4℃保存备用。用0.05 mol/L、pH 7.0磷酸缓冲液将0.6 mL、30% H_2O_2 稀释至100 mL作为底物。反应体系:底物1.0 mL,蒸馏水1.9 mL,酶液0.1 mL,共3 mL;对照用缓冲液代替酶液,测定 D_{560} 值。以每分钟 D_{560} 变化值为1个酶活单位(U_5)。

2 结果与分析

2.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化

粉蕉和巴西蕉在与香蕉枯萎病菌的互作过程中,PAL活性的变化结果表明:2个品种的香蕉体内PAL活性曲线总体上都呈上升趋势;未接种的香蕉体内PAL活性变化均较平缓,且总体活性变化都低于接种的相应品种;接种的粉蕉和巴西蕉PAL活性的变化趋势相似,均在接种后14 d出现第一个高峰,这与用组培苗接种香蕉后的显症时间基本吻合(图1)。

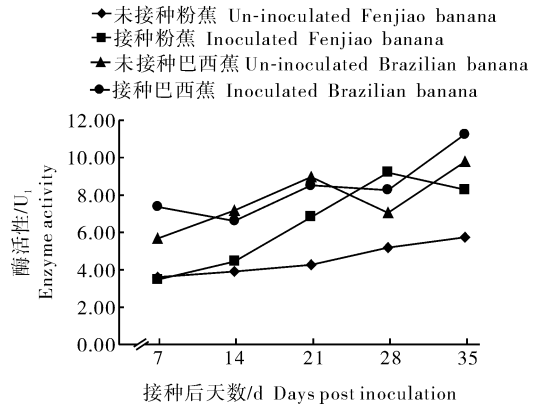


图1 香蕉与 Foc 4 互作过程中 PAL 活性的变化
Fig. 1 Changes of PAL activities during the interactions of banana plantlets with Foc 4

2.2 过氧化物酶(POD)活性的变化

粉蕉和巴西蕉在与香蕉枯萎病菌的互作过程中,POD活性的变化结果表明:除了粉蕉在接种后14 d外,接种的香蕉体内POD活性都高于未接种的相应品种;接种后2个品种的PAL活性都是先下降后上升,然后再缓慢下降;粉蕉的POD活性高峰出现在接种后28 d,而巴西蕉的POD活性高峰出现在接种后21 d(图2)。

2.3 多酚氧化酶(PPO)活性的变化

粉蕉和巴西蕉在与香蕉枯萎病菌的互作过程中,PPO活性的变化结果表明:接种与未接种2个品种的香蕉体内PPO活性虽然都有起伏,但总体都随时间变化而逐渐上升;未接种的香蕉PPO活性变化总体低于接种的香蕉;接种的粉蕉PPO活性变化呈平缓上升的趋势,在接种后21 d有一小高峰;接种的巴西蕉PPO活性变化起伏较大,在接种后14 d有一小高峰,但在28 d时有一低谷出现(图3)。

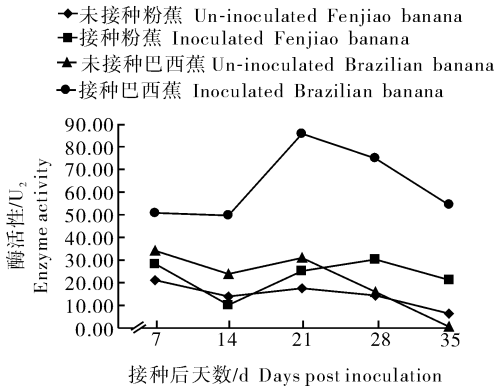


图 2 香蕉与 *Foc 4* 互作过程中 POD 活性的变化

Fig. 2 Changes of POD activities during the interactions of banana plantlets with *Foc 4*

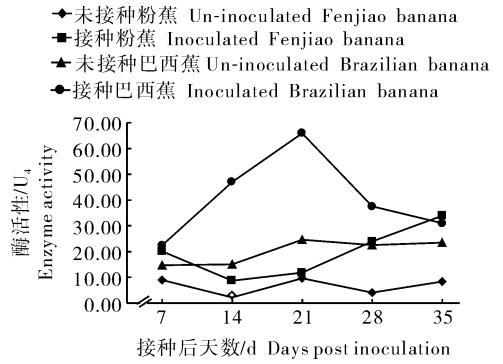


图 4 香蕉与 *Foc 4* 互作过程中 SOD 活性的变化

Fig. 4 Changes of SOD activities during the interactions of banana plantlets with *Foc 4*

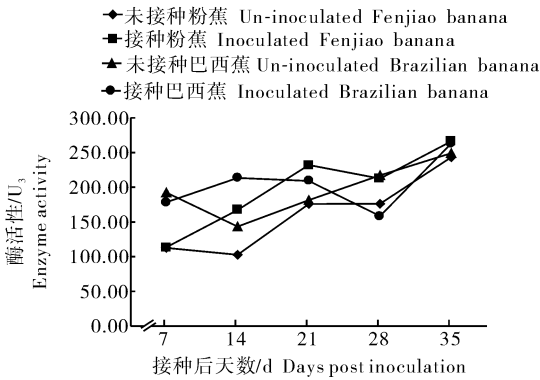


图 3 香蕉与 *Foc 4* 互作过程中 PPO 活性的变化

Fig. 3 Changes of PPO activities during the interactions of banana plantlets with *Foc 4*

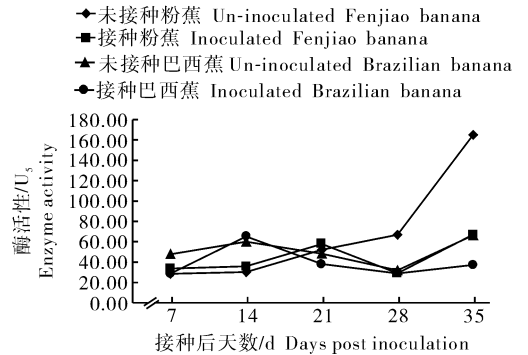


图 5 香蕉与 *Foc 4* 互作过程中 CAT 活性的变化

Fig. 5 Changes of CAT activities during the interactions of banana plantlets with *Foc 4*

2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

粉蕉和巴西蕉在与香蕉枯萎病菌的互作过程中, SOD 活性的变化结果表明: 未接种的香蕉体内 SOD 活性变化均较平缓, 且总体变化都低于接种的相应品种。这表明香蕉在受到枯萎病菌感染后, 体内的酶防御系统发生紊乱。接种后粉蕉的 SOD 活性变化趋势是在 14 d 前均略微下降, 14 d 后都呈平缓上升趋势; 接种后巴西蕉的 SOD 活性变化为单峰曲线, 峰值出现在 21 d (图 4)。

2.5 过氧化氢酶(CAT)活性的变化

CAT 是植株体内的一种分解过氧化氢、使植株解毒的酶。粉蕉和巴西蕉在与香蕉枯萎病菌的互作过程中, CAT 活性的变化结果表明: 接种与未接种的香蕉体内 CAT 活性变化大致相似, 在生长前期 CAT 活性变化均相对较缓, 且都有一个小高峰; 接种后 28 d 活性变化都呈上升趋势, 并且未接种的上升幅度比相应的接种品种要大 (图 5)。

3 讨论

植物的防御体系是一个多因素相互作用的复杂体系, 其中包括各种防御酶和抗病物质等因素^[3-6]。植物体内含有多种防御酶, 如 PAL、POD、PPO、SOD 和 CAT 等, 这些酶被认为是植物抗病性表现的指标之一^[6]。

本试验对香蕉与枯萎病菌互作过程中香蕉苗体内的 5 种防御酶的活性变化进行了观察与分析。结果表明: 香蕉苗体内的 PAL、POD 和 PPO 这 3 种酶活性受枯萎病菌的侵染诱导而升高, 防御反应启动, 在病菌与香蕉的互作过程中积极参与了香蕉体内的抗病反应; 香蕉体内的这 3 种酶的活性高峰期出现在接种后 14 d 或 21 d, 这 and 前人报道的香蕉组培苗伤根接种的潜育期 (13~18 d) 是吻合的^[12]。接种后香蕉苗前期酶活性的提高可能有助于寄主抑制枯萎病菌在体内的繁殖和运转, 酶的活性越强, 对病菌的抑制作用越好, 最终导致寄主的抗病反应。对于 SOD 而言, 接种后香蕉苗体内的 SOD 活性总体上

高于未接种的对照,表明枯萎病菌侵染后,香蕉体内的 SOD 活性受诱导有所变化,SOD 与香蕉枯萎病菌的侵染有关。对于 CAT 而言,接种与未接种的香蕉体内 CAT 活性变化大致相似,表明 CAT 酶活性与枯萎病菌的侵染无关。综上所述,香蕉与枯萎病菌互作过程中香蕉体内的 PAL、POD、PPO 和 SOD 这 4 种酶活性变化与枯萎病菌的诱导有关。因此,可将 PAL、POD、PPO 和 SOD 作为衡量香蕉植株抗枯萎病的生理指标,以指导今后的香蕉抗病育种工作。

参 考 文 献

- [1] 卓国家,黄有宝,吴运新,等. 香蕉枯萎病的综合防治技术[J]. 植物检疫,2003(5):279-280.
- [2] 谢梅琼,杨媚,杨迎青,等. 香蕉枯萎病菌的风险性分析[J]. 果树学报,2011,28(2):284-289.
- [3] RAGUCHANDER T, SHANMUGAM V, SAMIYAPPAN R. Biological control of Panama wilt disease of banana [J]. Madras Agricultural Journal,2000,87(46):320-321.
- [4] 唐倩菲,杨媚,周而勋,等. 香蕉受枯萎病菌侵染后内源激素含量的变化[J]. 华南农业大学学报,2006,27(2):42-44.
- [5] 黄永辉,李瑜婷,范家平,等. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种产毒条件的优化[J]. 华中农业大学学报,2011,30(5):594-598.
- [6] 杨媚,曾蕊,李瑜婷,等. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种毒素解毒剂的筛选及对香蕉防御酶活性的影响[J]. 果树学报,2012,29(1):99-104.
- [7] 胡适连,王碧青. 香蕉枯萎病组培苗伤根接种试验[J]. 广东农业科学,1988,15(2):38-39.
- [8] 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,2000:1-278.
- [9] 朱广廉,钟海文,张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京:北京大学出版社,1990:1-269.
- [10] 徐海涛. 水稻纹枯病菌致病相关因子的研究[D]. 广州:华南农业大学图书馆,2003:1-74.
- [11] 曾永三. 豇豆与锈菌互作的生化反应及其与抗性的关系[D]. 广州:华南农业大学图书馆,2000:1-108.
- [12] 王璧生,罗启浩. 广东香蕉的主要病害及其防治[J]. 中国南方果树,1997,26(3):33-35.

Changes of defensive enzyme activities during the interactions of banana plantlets with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4

ZENG Rui^{1,2} CHEN Qi-guang² LU Lu² TANG Qian-fei² ZHOU Er-xun²

1. Department of Horticulture and Landscape Architecture, Shanghai Vocational College of Agriculture and Forest, Shanghai 201600, China;

2. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract In order to investigate the changes of defensive enzyme activities in banana infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 (*Foc* 4), the activities of phenylalanine ammonialyase (PAL), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined during the interactions of Fenjiao (ABB) and Brazilian (AAA) banana plantlets with *Foc* 4 by using artificial inoculation method of dipping injured-roots in conidial suspension. The results showed that the activities of PAL, POD, PPO and SOD were higher in the infected bananas than those in the corresponding non-infected controls, and the changes in activities of PAL, POD, PPO and SOD in infected bananas were more complicated than those in the corresponding non-infected controls, which suggested that these four enzymes actively participated in the resistant response in bananas during the infection of *Foc* 4. However, the variation trends of CAT activities in both infected and non-infected controls were general similar, indicating that the activity variation of CAT is not related to the infection of *Foc* 4.

Key words *Musa* spp.; *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*; host-pathogen interactions; defensive enzymes

(责任编辑:陈红叶)