

西瓜花叶病毒诱导对不同抗性美洲南瓜 防卫基因表达的影响

张树武¹, 徐秉良^{1*}, 刘佳¹, 薛应钰¹, 陈荣贤²

(1 甘肃农业大学 草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州 730070; 2 甘肃省武威金苹果有限责任公司, 甘肃武威 733000)

摘要: 为了明确防卫基因 *PAL* 与美洲南瓜抗西瓜花叶病毒 (watermelon mosaic virus, WMV) 之间的关系, 通过室内接种和实时荧光定量 PCR 技术, 测定了 WMV 侵染对不同抗性美洲南瓜体内防卫基因 *PAL* 表达的影响。结果表明: (1) 室内测定显示, 抗病品种 GBRV-8 发病率和病情指数 (15.6% 和 14.2) 显著低于感病品种 ‘光板’ (91.1% 和 65.9)。 (2) 实时荧光定量 PCR 表明, 接种 WMV 后不同抗感品种不同组织部位 *PAL* 基因相对表达量随着接种时间增加, 整体呈现出先增加后降低的趋势, 而且不同组织部位 *PAL* 基因相对表达量总体呈现出叶片较高, 叶柄和茎秆次之。 (3) 接种后 5 个品种不同组织部位 *PAL* 基因相对表达量与对照相比均存在显著差异, 且抗病和中抗品种不同组织部位 *PAL* 基因相对表达量显著高于感病品种, 尤其抗病品种 GBRV-8 不同组织部位 *PAL* 基因相对表达量最高, 感病品种光板最低。研究认为, 防卫基因 *PAL* 表达量与美洲南瓜品种抗病毒病强弱密切相关。

关键词: 美洲南瓜; 西瓜花叶病毒 (WMV); 组织部位; 防卫基因 *PAL*

中图分类号: Q789; Q945.79 **文献标志码:** A

Induction Expression of Defense Gene in Different Varieties of *Cucurbita pepo* by Watermelon Mosaic Virus Infection

ZHANG Shuwu¹, XU Bingliang^{1*}, LIU Jia¹, XUE Yingyu¹, CHEN Rongxian²

(1 Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2 Wuwei Golden Apple Limited Liability Company, Wuwei, Gansu 733000, China)

Abstract: In order to determine the relationship between the defense gene of *PAL* and resistance of *Cucurbita pepo* to watermelon mosaic virus (WMV), we determined and analyzed changes of *PAL* gene expression in different resistant varieties of *C. pepo* tissue by the methods of indoor inoculation and real-time PCR after inoculated with the pathogen of WMV. (1) *In vitro*, the results showed that the incidence and disease index of disease-resistant variety of GBRV-8 (15.6% and 14.2) were significantly lower than that of the susceptible variety of Guangban (91.1% and 65.9). (2) Real-time PCR results showed that the relative expression of *PAL* gene was increased after inoculated with the pathogen of WMV in different tissues and different resistant varieties of *C. pepo* at initial stage, but decreased later. Also, the relative expression of *PAL* gene in the leaves of different disease-resistant varieties of *C. pepo* was significantly higher than that

收稿日期: 2015-07-19; 修改稿收到日期: 2015-10-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31060261, 31460518)

作者简介: 张树武 (1986-), 男, 在读博士研究生, 主要从事作物病害及其综合治理研究。E-mail: zhangsw704@126.com

* 通信作者: 徐秉良, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害及其防治研究。E-mail: xubl@gsau.edu.cn

in petioles and stems after inoculated with WMV. (3) The relative expression of *PAL* gene in five different varieties was significantly different from the control after determined at different days, and the relative expression of *PAL* gene in resistant varieties and middle-resistant varieties were higher than that in susceptible varieties. The relative expression of *PAL* gene in resistant varieties of GBRV-8 was the highest and susceptible varieties of Guangban was the lowest. Therefore, the relative expression of *PAL* gene had a positive correlation to the disease resistance of varieties.

Key words: *Cucurbita pepo*; watermelon mosaic virus (WMV); tissue; defense gene of *PAL*

近年来随着南瓜(*Cucurbita pepo*)栽培面积的不断扩大,南瓜病毒病发生愈来愈严重,特别是在高温干旱年份发病较为严重,造成了产量降低、品质下降和商品性差等问题,给南瓜生产带来了巨大的经济损失^[1-3]。南瓜病毒病典型症状主要表现为深绿相间的斑驳花叶,或形成深绿色相间带,尤其重病叶表现为凹凸不平,脉皱曲变形。一般新叶症状较老叶明显,重病株茎基和顶叶扭缩,果实出现褪绿斑^[3]。目前主要采用化学防治措施对南瓜病毒病进行防治,但由于化学农药残留和环境污染等问题而受到限制^[4]。鉴于化学防治措施存在的问题,以及近年来随着分子生物学技术的飞速发展,目前利用分子生物学技术手段选育抗病品种已是防治南瓜病毒病发生和危害的最有效途径之一。

相关文献表明,在一定环境条件下,寄主植物与病原物相互作用过程中,苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)可作为衡量植物体内防卫反应的一种重要生理指标,且其活性受植物体内抗病基因的表达调控^[5]。同时,在寄主植物与病原菌互作的过程中, PAL 活性通常呈现出规律性的变化。当寄主植物受到病原菌侵染后,其体内 PAL 活性通常会升高,原因是因为 PAL 能够催化 L-苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸,而反式肉桂酸在木质素、植保素和酚类等抗性物质合成中具有重要的作用,并已通过转 *PAL* 基因证实了木质素、酚类物质和植保素等抗性物质在植物生长发育过程和抗病中的作用^[6-7]。金庆超等^[8]将烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、烟草坏死病毒(tobacco necrosis virus, TNV)和南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus, SBMV)接种于矮生菜豆(*Phaseolus vulgaris*)叶片后,结果表明在接种后 24~120 h 内,接种 3 种病毒后植株体内木质素含量显著高于未接种植株。李惠华等^[9]对不同品种番木瓜(*Chaenomeles sinensis*)接种环斑花叶病毒(papaya ring spot virus, PRSV)后,其植株体内 PAL 活性显著高于对照。赵荣乐等^[10]研究了黄瓜花叶病毒新疆株(cucumber mosaic virus-XJ, CMV-XJ)侵染抗

性不同的甜瓜(*Cucumis melo*)品种后 PAL 活性变化,结果表明与对照相比,被侵染植株体内酶的活性均高于对照,且抗病品种增加幅度是感病品种的 2 倍,但是目前对植物抗病方面的研究大多停留在酶活水平,而且在抗病方面的研究较多为植物病原真菌,但有关植物病毒方面的研究较少,尤其有关防卫基因 *PAL* 与美洲南瓜抗病毒病害方面的研究目前尚未见报道。

因此,本研究以美洲南瓜不同抗感病毒品种为材料,利用实时荧光定量 PCR 技术对不同抗感品种接种西瓜花叶病毒(watermelon mosaic virus, WMV)后,不同品种发病率、病情指数和 *PAL* 基因相对表达量进行测定,旨在明确 *PAL* 基因与植物抗病性之间的关系,对于拓宽美洲南瓜抗病种质资源和提升南瓜抗病种质创新具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

美洲南瓜品种分别为 GBRV-6、GBRV-8、GBRV-12、GBRV-13 和‘光板’,5 份材料均由武威金苹果有限责任公司选育和提供。供试毒源 WMV 由甘肃农业大学草业学院植物病理实验室提供和保存,并经汁液摩擦接种于感病美洲南瓜植株扩繁。

荧光染料(Green-2-Go Real-time PCR Master-mix)、RNase-free DNase 试剂盒和 cDNA 第 1 链合成试剂盒均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供;RNA 提取试剂盒、磷酸缓冲液(pH 7.2)和石英砂均由北京天根生化科技有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 不同抗感品种温室种植 2013 年 9~12 月在甘肃农业大学日光温室种植 5 个不同抗性品种。将不同抗感病毒品种的美洲南瓜种子经 5% NaClO 消毒 3 min,并经无菌水充分冲洗后置于无菌水中浸泡 12 h。然后将浸泡的种子均匀置于直径为 9 cm 培养皿,培养皿中铺有 1 层浸湿的纱布和 2 层滤纸,25 °C 恒温箱中催芽,在萌发过程中及时补充无菌水。待种子露白后每盆种植 15 株,每个品种种植

6 盆,共 90 株。试验于温度为 25 °C、相对湿度为 60%、16 h/8 h 光暗交替的日光温室中进行。

1.2.2 病毒汁液制备 称取 1 g 扩繁后的新生病毒叶片置于灭菌研钵中,然后加入 8 mL 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)和少量 600 目石英砂于研钵中充分研磨并保存备用。

1.2.3 病毒接种和接种后发病率及病情指数测定 采用汁液摩擦接种法进行接种。待幼苗生长到 2 叶期时进行接种,接种时在供试植株叶片的正面均匀撒取少量石英砂,并用手指蘸取接种的病毒汁液,在叶片正面朝一个方向轻轻摩擦。接种后用无菌水冲洗叶片表面的残留物,试验以磷酸缓冲液和石英砂作为对照,每个处理和对照重复 6 次。接种后幼苗遮光处理 24 h,然后置于 25 °C 和 16/8 h 光照的温室中进行培养(附有防虫网)。接种 3 d 后开始采样并观察发病症状和统计发病情况,并每隔 3 d 采 1 次样,连续采样 7 次,分别计算其发病率和病情指数。病情指数分级标准参照李凤梅等^[11]方法。发病率和病情指数计算公式分别为:

$$\text{发病率}(\%) = \frac{\text{发病植株个数}}{\text{调查总植株个数}} \times 100$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{病级数})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值}} \times 100$$

1.2.4 抗性分类标准 接种 3 d 后开始调查发病情况,并根据抗性分类标准进行抗感分级,筛选美洲南瓜抗病毒品种。抗性分类标准参考文朝慧等^[12]方法。

1.2.5 RNA 提取和检测及 cDNA 第 1 链合成 接种病毒汁液后第 3 d 开始采集不同抗感品种处理组和对照组中的叶片(去除叶脉)、叶柄和茎秆,每隔 3 d 采 1 次样,然后采用植物组织总 RNA 提取试剂盒提取处理组和对照组中不同组织中总 RNA,采用 RNase-free DNase 试剂盒去除 DNA,并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 完整性,同时利用紫外分光光度计(NanoPhotometer™ Pearl,德国 Implen 公司)测定 RNA OD_{260/280}、OD_{260/230} 和浓度。cDNA 第 1 链合成方法具体参照生工生物工程(上海)股份有限公司提供的第 1 链 cDNA 合成试剂盒的使用方法进行合成。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 参照生工生物工程(上海)股份有限公司提供的荧光染料说明书,并以不同抗性品种 cDNA 为模板,根据刘佳等^[13]已克隆的美洲南瓜 PAL 基因 cDNA 全长序列和 Primer 5.0 软件进行引物设计(表 1)。利用特异性引物(表

表 1 PAL 和 Actin 基因扩增引物

Table 1 Specific primers for PAL gene and Actin gene

引物名称 Names of primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')
PAL-F	AACCTTCTCCTCAATGGCTTGGT
PAL-R	TGAAACATCAATCAAAGGGTTG
ACTIN-F	TGGACAATGGAACGGAATG
ACTIN-R	CGTCTGTGGAAGTGCTGAG

1)对其 PAL 和 Actin 基因进行实时荧光定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 反应总体系 20 μL:Green-2-Go PCR Mastermix(10 μL)、cDNA 模版(3 μL)、400 nmol·L⁻¹正反向引物(各 1 μL)和 RNase-Free ddH₂O(5 μL)。反应程序为 95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火延伸 60 s,共 40 个循环。

1.2.7 相对定量表达测定 PAL 基因表达量测定参照 Actin 基因作为标准进行相对定量。相对定量计算方法采用 2^{-ΔΔC_t} 方法^[14-15],且各处理和对照均重复 6 次,并以接种 WMV 后第 1 天 PAL 基因的相对表达量作为 1,计算其它不同时间内不同抗性品种叶片、叶柄和茎秆中 PAL 基因相对表达量。

1.3 数据统计

采用 SPSS(SPSS V16.0,SPSS Ltd.,Chicago,IL)软件和单因素方差分析统计各处理平均数的差异,并利用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 接种 WMV 后发病症状观察

不同抗感病毒品种接种 WMV 后感病品种发病时间显著早于抗病品种,且感病和抗病品种分别于接种后第 9 和 12 天开始发病。同时,接种后第 21 天,感病品种光板叶片出现明显的皱缩和花叶等症状(图 1,A),而对照均未发病(图 1,C)。抗病品种 GBRV-8 叶片出现轻微的花叶症状(图 1,B),而对照均未发病(图 1,D)。

2.2 接种 WMV 后发病率和病情指数统计

不同抗感品种发病率和病情指数随着接种时间的增加不断增加,但抗病品种增加幅度较低,而感病品种增加幅度较高,且不同抗感品种发病率和病情指数存在显著差异(表 2 和表 3)。发病严重程度和抗性分类标准测定结果表明,接种后第 21 天,GBRV-6 发病率和病情指数分别为 34.4%和 21.1,抗性分类为中抗;GBRV-8 发病率和病情指数分别为 15.6%和 14.2,抗性分类为抗病;GBRV-12 发病

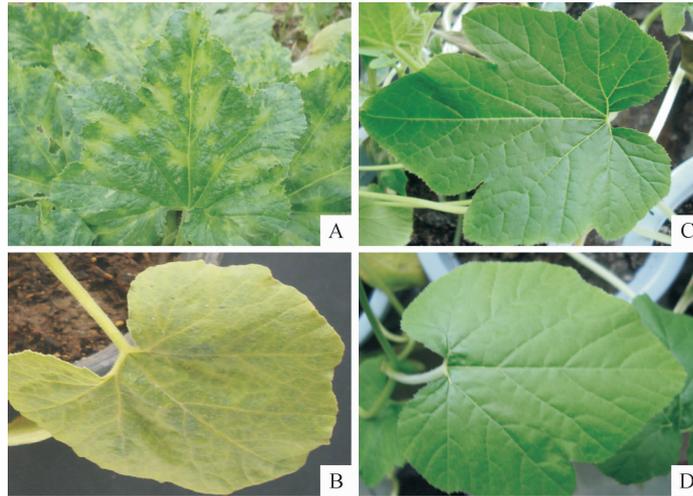


图 1 接种 WMV 21 d 后不同品种发病症状

A,B. 接种处理;C,D. 对照;A,C. 光板;B,D. GBRV-8

Fig. 1 The symptom of different varieties of *C. pepo* after inoculation with WMV on 21th day

A,B. Inoculated with WMV;C,D. Control;A,C. Guangban;B,D. GBRV-8

表 2 不同品种接种 WMV 后发病率

Table 2 The disease incidence of different varieties of *C. pepo* after inoculation with WMV

品种 Variety	处理 Treatment	处理不同时间的发病率 Disease incidence at different times after inoculation/%						
		3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
GBRV-6	处理 Treatment	0.0	0.0	3.3 b	12.2 b	21.1 b	26.7 b	34.4 b
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d
GBRV-8	处理 Treatment	0.0	0.0	2.2 b	4.4 c	7.8 d	11.1 d	15.6 c
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d
GBRV-12	处理 Treatment	0.0	0.0	0.0 c	3.3 c	10.0 c	15.6 c	16.7 c
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d
GBRV-13	处理 Treatment	0.0	0.0	0.0 c	4.4 c	12.2 c	15.6 c	18.9 c
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d
光板 Guangban	处理 Treatment	0.0	0.0	20.0 a	34.4 a	48.9 a	68.9 a	91.1 a
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d

注:表中数据均为平均数。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note:The data in the table are mean;Different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level. The same as below.

表 3 不同品种接种 WMV 后病情指数

Table 3 The disease index of different varieties of *C. pepo* after inoculation with WMV

品种 Variety	处理 Treatment	处理不同时间的病情指数 Disease index at different time after inoculation						
		3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
GBRV-6	处理 Treatment	0.0	0.0	3.3 b	7.8 b	11.3 b	16.9 b	21.1 b
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 d
GBRV-8	处理 Treatment	0.0	0.0	2.2 b	4.4 c	7.8 c	11.5 c	14.2 c
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 d
GBRV-12	处理 Treatment	0.0	0.0	0.0 c	3.3 c	10.0 b	15.6 b	15.8 c
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 d
GBRV-13	处理 Treatment	0.0	0.0	0.0 c	4.4 c	12.2 b	15.6 b	18.2 b
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 d
光板 Guangban	处理 Treatment	0.0	0.0	11.1 a	16.7 a	33.3 a	53.7 a	65.9 a
	对照 Control	0.0	0.0	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 d

率和病情指数分别为 16.7%和 15.8,抗性分类为抗病;GBRV-13 发病率和病情指数分别为 18.9%和 18.2,抗性分类为抗病;光板品种发病率和病情指数分别为 91.1%和 65.9,抗性分类为感病。

2.3 接种 WMV 后不同品种 PAL 基因表达

经 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性表明,5 个品种不同组织部位总 RNA 28S、18S 和 5S 条带清晰,且 28S 条带亮度约为 18S 的 2 倍,即表明提取的总 RNA 没有降解,完整性较好,且不存在 DNA 污染。同时,其 OD_{260/280} 均在 1.9~2.0 左右,OD_{260/230} 均大于 2.0,即提取的 RNA 质量和纯度较高。

图 2~图 6 显示,与对照相比,接种后 5 个抗病品种不同组织部位 PAL 基因相对表达量显著高于对照。抗病品种 GBRV-8、GBRV-12 和 GBRV-13,中抗品种 GBRV-6,与感病品种‘光板’相比,不同组

织部位 PAL 基因相对表达量存在显著差异,且抗病和中抗品种不同组织部位 PAL 基因相对表达量显著高于感病品种,其中 GBRV-8 不同部位 PAL 基因相对表达量最高,GBRV-6、GBRV-12 和 GBRV-13 次之,感病品种‘光板’最低。同时,5 个品种不同组织部位 PAL 基因相对表达量随着接种时间的增加,整体呈现出先增加后降低的趋势,且叶片 PAL 基因相对表达量最高,叶柄次之,茎秆最低。

接种 WMV 后前 3 d 内,GBRV-8 叶片中 PAL 基因相对表达量与对照相比无显著差异,增加幅度较低。处理 6 d 后,不同组织部位 PAL 基因相对表达量呈上升趋势,处理后 12 d 叶片中表达量达最大。叶柄和茎秆中 PAL 基因相对表达量在接种后 6 d 内,增加幅度较小,且无显著差异,分别于处理后 15 和 12 d 达最大,整体增加幅度显著低于叶片中 PAL 基因的增加幅度(图 2)。

抗病品种 GBRV-12 和 GBRV-13、中抗品种

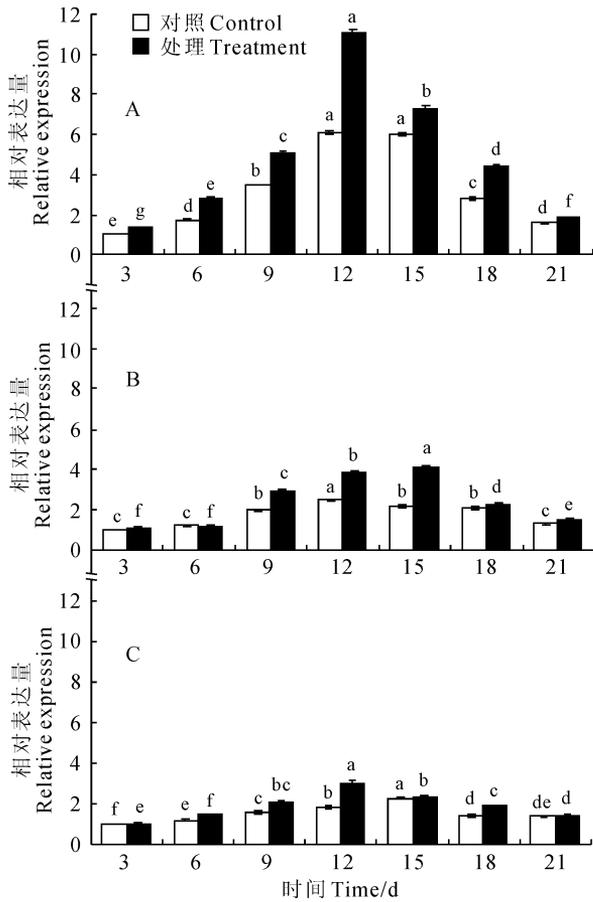


图 2 接种 WMV 后不同时间抗病品种 GBRV-8 不同组织部位 PAL 基因表达 A. 叶片;B. 叶柄;C. 茎秆;图中不同小写字母表示差异显著(P<0.05);下同

Fig. 2 PAL gene relative expression in different tissues of GBRV-8 at different times after inoculation with WMV A. Leaves;B. Petioles;C. Stems;Different normal letter mean significant difference at 0.05 level;The same as below

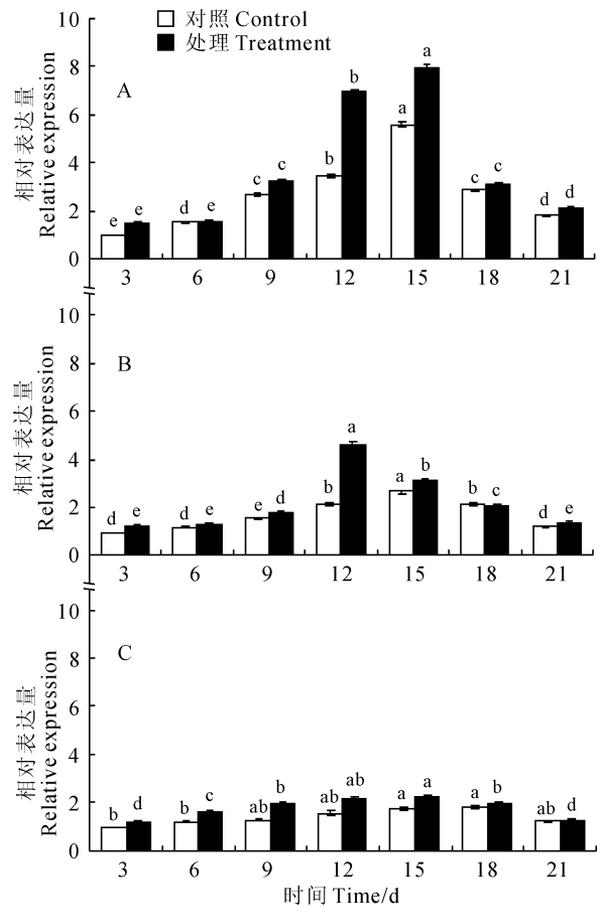


图 3 接种 WMV 后不同时间抗病品种 GBRV-12 不同组织部位 PAL 基因表达

Fig. 3 Changes of PAL gene relative expression in different tissues of GBRV-12 at different times after inoculation with WMV

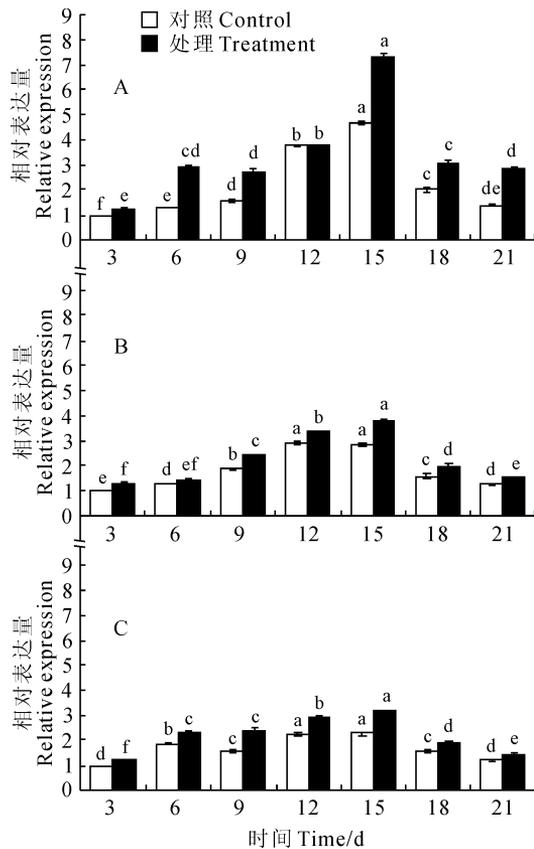


图4 接种 WMV 后不同时间抗病品种 GBRV-13 不同组织部位 *PAL* 基因表达

Fig. 4 Changes of *PAL* gene relative expression in different tissues of GBRV-13 at different times after inoculation with WMV

GBRV-6, 叶片中 *PAL* 基因相对表达量增加较为显著, 并且在处理后 6 d 内增加幅度较小。叶片、叶柄和茎秆中 *PAL* 基因相对表达量在处理 12 或 15 d 达最大, 而且叶片中 *PAL* 基因相对表达量显著高于叶柄和茎秆(图 3~5)。感病品种‘光板’接种 WMV 后, *PAL* 基因相对表达量增加幅度较小。在接种后 3 d, 与对照相比, 叶片、叶柄和茎秆中 *PAL* 基因相对表达量无显著差异。但是随着处理时间的增加, 接种后 6 d *PAL* 基因相对表达量开始上升, 且与对照相比上升幅度较大, 并于接种后 12 或 15 d 达到最大值, 但是随着发病严重程度的增加, 在接种后 21 d, 叶片和叶柄中 *PAL* 基因相对表达量低于对照, 茎秆中 *PAL* 基因相对表达量在接种后 18 d 开始低于对照(图 6)。

3 讨论

PAL 是植物抗病代谢过程密切相关的一种酶, 其可将苯丙氨酸转化成肉桂酸, 为植保素和木质素

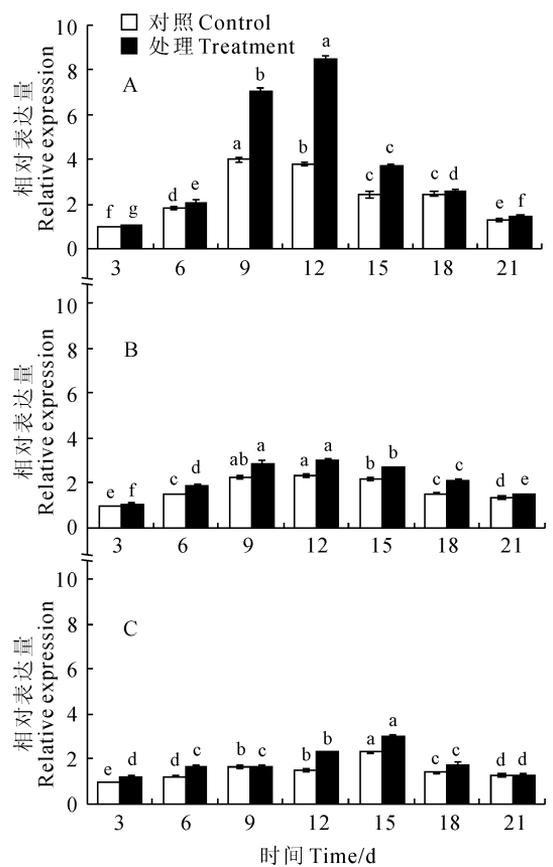


图5 接种 WMV 后不同时间抗病品种 GBRV-6 不同组织部位 *PAL* 基因表达

Fig. 5 Changes of *PAL* gene relative expression in different tissues of GBRV-6 at different times after inoculation with WMV

的合成提供前体, 可作为衡量植物体内防卫反应的一种重要生理指标^[16-17]。同时, 木质素是一类复杂的酚类聚合物, 能够通过加强植物细胞壁和增加组织木质化形成病原入侵的机械屏障, 因此, *PAL* 与植物的抗病性具有密切的关系^[18]。

王敬文等^[19]首先发现当病原菌侵染植物后, 植物体内 *PAL* 活性与早期的防卫反应具有密切的关系, 并呈现出规律性的变化, 如在欧芹 (*Petroselinum crispum*) 叶片组织中, 真菌侵染点周围发生了过敏性坏死的组织中 *PAL* 活性显著上升。另外, 余磊等^[20]研究表明将甘薯长喙壳病菌 (*Ceratocystis fimbriata*) 接种甘薯 (*Ipomoea batatas*) 块根后, 其块根组织中 *PAL* 活性均迅速增高。赵荣乐等^[10]采用汁液摩擦接种法将 CMV-XJ 接种于抗性不同的甜瓜品种叶片中, 结果表明与对照相比接种后被侵染的植株体内 *PAL* 活性显著高于对照, 而且抗性品种增高的幅度是感性品种的 2 倍。陈刚^[21]测定了不同南瓜品种接种白粉菌后 *CCR* 基因的表达情况,

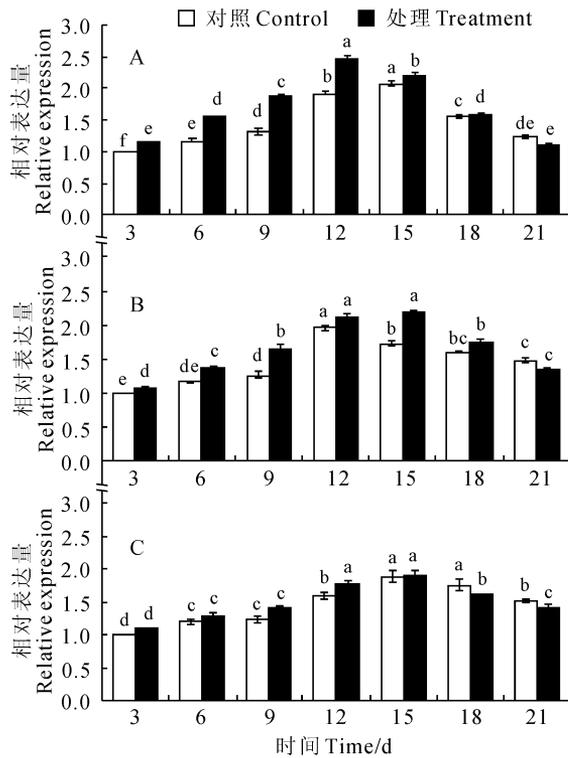


图6 接种 WMV 后不同时间感病品种‘光板’不同组织部位 PAL 基因表达

Fig. 6 Changes of PAL gene relative expression in different tissues of ‘Guangban’ at different times after inoculation with WMV

结果表明与对照相比 CCR 基因净增加量显著升高,且抗性越强,CCR 基因表达量越高。本试验采用汁液摩擦接种法对不同抗性美洲南瓜叶片接种 WMV,然后在接种后不同时间内利用实时荧光定量 PCR 对其不同部位 PAL 基因相对表达量进行测定,表明接种 WMV 后抗病品种 GBRV-8 叶片、叶柄和茎秆中 PAL 基因相对表达量显著高于其余抗

病品种、中抗品种和感病品种,该研究结果与前期的研究结果基本一致。

另外,初期随着接种时间的增加,5 个品种不同部位 PAL 基因相对表达量均呈现出先增长后降低的趋势,但在接种后期,感病品种 PAL 基因相对表达量低于对照,而抗病和中抗品种始终高于对照。这一结果与陈刚^[21]研究结果基本一致,不同抗白粉病南瓜品种 CCR 基因表达量呈现出先增加后降低的趋势,接种后期,与对照相比感病品种 CCR 基因净增加量为负值。同时,田雪亮等^[22]研究发现利用黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 粗毒素处理抗感品种黄瓜 (*Cucumis sativus*) 幼苗后,其体内 PAL 活性均呈现先升高后降低的趋势,且抗病品种显著高于感病品种。在本试验过程中发现,接种后不同抗感品种不同组织部位 PAL 基因相对表达量存在显著的差异,表现为叶片显著高于叶柄和茎秆,其原因可能是由于 PAL 基因的表达具有组织特异性^[23]。前期研究表明, PAL 可作为衡量植物体内防卫反应的一种重要诱导酶,外界因素(机械损伤、毒素处理、病原感染和昆虫取食等)可以诱导 PAL 基因的表达,而且这种诱导属于转录水平上的诱导,具有组织特异性^[24-27],同时也可能与 PAL 基因不同基因家族成员在不同部位表达量不同有关^[28]。

因此,WMV 侵染对美洲南瓜防卫基因 PAL 表达量具有显著的影响,且 PAL 基因相对表达量与美洲南瓜抗 WMV 活性的强弱具有一定的相关性,抗病品种 PAL 基因相对表达量显著高于感病品种,但目前有关 PAL 基因与美洲南瓜抗病方面的研究较少,尤其在其作用机理等方面还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 李凤梅. 黑龙江省南瓜病毒病原鉴定和品种资源抗性筛选的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.
- [2] LI F M(李凤梅), CUI CH SH(崔崇士), YANG G H(杨国慧). Research advance of squash virus[J]. *Journal of Northeast Agricultural University* (东北农业大学学报), 2002, **33**(1): 1-7 (in Chinese).
- [3] 陈洁云. 葫芦科植物病毒病研究[D]. 杭州:浙江大学,2003.
- [4] 颜惠霞. 南瓜白粉病品种抗病性及抗病机理研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [5] MATROS A, AMINE S, KEUIG B, et al. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y[J]. *Plant Cell Environment*, 2006, **29**(1): 126-137.
- [6] SHADLE G L, WESLEY S V, KORTH K, et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase[J]. *Phytochemistry*, 2003, **64**(1): 153-161.
- [7] XUE Y Y(薛应钰), SHI G Y(师桂英), XU B L(徐秉良), et al. Studies on morphology of seed coat development and its related enzyme activity assay in *Cucurbita pepo*[J]. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 2011, **20**(2): 23-30 (in Chinese).
- [8] JIN Q CH(金庆超), YE H ZH(叶华智), ZHANG M(张敏). Relationship between the activity of PAL and resistance of corn to maize

- sheath blight[J]. *Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报), 2003, **21**(2): 116—118(in Chinese).
- [9] LI H H(李惠华), XIE ZH N(谢志南), LAI R Y(赖瑞云), *et al.* Changes of PAL, PPO, POD activities in different papaya cultivars infected with papaya ring spot virus[J]. *Subtropical Plant Science*(亚热带植物科学), 2007, **36**(4): 1—4(in Chinese).
- [10] ZHAO R L(赵荣乐). Changes of phenylalanine ammonia-lyase and chlorophyll in muskmelon plants infected by CMV-Xinjiang isolate [J]. *Journal of Jishou University*(Nat. Sci. Edi.) (吉首大学学报·自然科学版), 2006, **27**(3): 78—81(in Chinese).
- [11] LI F M(李凤梅), ZHANG J H(张俊华), CUI CH SH(崔崇士). Study on inoculation methods and physiological and biochemical indexes with pumpkin virus disease[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*(东北农业大学学报), 2005, **36**(3): 301—305(in Chinese).
- [12] WEN ZH H(文朝慧), LIU Y L(刘雅莉). Identification of zucchini yellow mosaic virus infecting squash and zucchini in Gansu Province [J]. *Plant Protection*(植物保护), 2010, **36**(4): 120—122(in Chinese).
- [13] LIU J(刘 佳), XU B L(徐秉良), XUE Y Y(薛应钰), *et al.* Cloning and expression analysis of PAL gene in seed coat of *Cucurbita pepo* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2014, **47**(6): 1 216—1 226(in Chinese).
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408.
- [15] SULLIVAN M L. Phenylalanine ammonia-lyase genes in red clover: expression in whole plants and in response to yeast fungal elicitor [J]. *Biologia Plantarum*, 2009, **53**(2): 301—306.
- [16] PELLEGRINI L, ROHFRITSCH O, FRITITG B, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1994, **106**: 877—886.
- [17] VURRO M, ELLIS B E. Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar [J]. *Plant Science*, 1997, **126**: 29—38.
- [18] LIU Y G(刘亚光), LI H Y(李海英), YANG Q K(杨庆凯). Study on the relationship between resistance of soybean and activities of PAL in leaves of soybean infected by *Cercospora sojina* Hara[J]. *Soybean Science*(大豆科学), 2002, **21**(3): 185—198(in Chinese).
- [19] WANG J W(王敬文), XUE Y L(薛应龙). Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase[J]. *Acta Phytophysiologia Sinica*(植物生理学报), 1981, **7**(4): 373—380(in Chinese).
- [20] YU L(余 磊), GAO L L(高玲玲), GUO J W(郭建伟), *et al.* Effect of *Ceratocystis fimbriata* infection on antioxidant enzyme activity of sweet potato root[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*(中国生态农业学报), 2011, **19**(1): 141—145(in Chinese).
- [21] 陈 刚. 美洲南瓜 CCR 基因与种皮发育和抗白粉病相关性研究及其功能分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [22] TIAN X L(田雪亮), LIU M T(刘鸣韬), YANG J R(杨家荣). Seed germination and growth of various resistant cucumber seedlings under *Fusarium oxysporum* crude toxin stress[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*(中国生态农业学报), 2008, **16**(6): 1 495—1 498(in Chinese).
- [23] CHEN G(陈 刚), XUE Y Y(薛应钰), BAI J P(白江平), *et al.* Expression variation of CCR in different tissues of *Cucurbita pepo*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **33**(5): 898—903(in Chinese).
- [24] KUMAR A, ELLIS B E. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution[J]. *Plant Physiology*, 2001, **127**(1): 230—239.
- [25] KOSTENYUK I A, ZON J, BURNS J K. Phenylalanine ammonia-lyase gene expression during abscission in citrus[J]. *Physiology Plantarum*, 2002, **116**(1): 106—112.
- [26] LAFUENTE M T, ZACARIAS L, MARTINEA-TELLEZ M A, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2003, **29**(3): 309—318.
- [27] CAMPOS R, NONOGAKI H, SUSLOW T, *et al.* Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves[J]. *Physiologia Plantarum*, 2004, **121**: 429—438.
- [28] YEO Y S, LEE S W, KIM Y H, *et al.* Restriction mapping of phenylalanine ammonia-lyase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*)[J]. *RDA Journal of Agricultural Science*, 1994, **36**(2): 187—192.

(编辑: 宋亚珍)