

富氢水处理对采后番茄果实灰霉病抗性的影响

卢 慧,伍冰倩*,王伊帆,刘妮妮,孟凡虹,胡振宇,赵瑞瑞,赵 玳**
(中央民族大学 生命与环境科学学院,北京 100081)

摘要:以采后番茄果实为试验材料,通过不同浓度富氢水(HRW)浸泡番茄果实,研究氢气对番茄果实抗灰霉病的作用效果。结果表明,与对照组(蒸馏水处理)相比,50%和75%HRW处理降低了损伤接种番茄果实的发病情况,接菌后9 d病斑面积分别是对照组的87.2%和77.9%;HRW处理可以不同程度地提高番茄果实的多酚氧化酶(PPO)活性,其中75%HRW处理组PPO活性在接菌后3 d与对照组差异达到极显著水平($P < 0.001$),是对照组的1.59倍;HRW处理提高了番茄果实中的一氧化氮含量,其中50%HRW处理组在接菌后3 d和9 d与对照组差异均达到极显著水平($P < 0.001$),分别是对照组的2.56倍和3.13倍。综上所述,氢气可能作为信号分子参与植物胁迫应答反应,增强了番茄果实对灰霉菌的抗性。

关键词:番茄果实;氢气;富氢水;灰霉菌;抗病性

中图分类号:S436.412.1 文献标志码:A 文章编号:1004-3268(2017)02-0064-05

Effects of Hydrogen-rich Water Treatment on Defense Responses of Postharvest Tomato Fruit to *Botrytis cinerea*

LU Hui,WU Bingqian*,WANG Yifan,LIU Nini,MENG Fanhong,HU Zhenyu,ZHAO Ruirui,ZHAO Heng**
(Department of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: In this study, we used postharvest tomato fruit as experimental materials, which were soaked in different concentrations of hydrogen-rich water(HRW) and then inoculated with *Botrytis cinerea*, to study the protective effect of HRW in tomato resistance to *Botrytis cinerea*. Compared with the control group treated by distilled water, 50% and 75% HRW treatments reduced the disease injury of inoculated tomato fruit, and the lesion areas at 9 d after inoculation were 87.2% and 77.9% of the control group, respectively. HRW treatment could increase the polyphenol oxidase(PPO) activity in different degree. The PPO activity of 75% HRW treatment group was significantly different from the control group after 3 d ($P < 0.001$), which was 1.59 times of the control group. The nitric oxide(NO) content of tomato fruit increased after HRW treatment. The NO content of 50% HRW treatment group was significantly different from the control group after 3 d and 9 d ($P < 0.001$), 2.56 and 3.13 times of the control group, respectively. This study indicated that hydrogen might be involved in plant stress responses as a signaling molecule, and enhanced the defense responses of tomato fruit to *Botrytis cinerea*.

Key words: tomato fruit; hydrogen; hydrogen-rich water; *Botrytis cinerea*; disease resistance

氢气(H_2)是一种小分子气体,具有抗氧化、抗炎和抗过敏的作用^[1-2],并能选择性地降低生物体内的羟基自由基($\cdot OH$)和过氧亚硝基($ONOO^-$)

含量^[3-4],常作为治疗性医疗气体用于临床。 H_2 可以通过直接吸入、以富氢水(hydrogen-rich water, HRW)的形式口服摄入、以富氢水生理盐水注射以

收稿日期:2016-10-21

基金项目:中共中央组织部“千人计划”项目;中央民族大学学科建设项目(YDZXXK201618)

作者简介:卢 慧(1985-),女,湖南长沙人,在读博士研究生,研究方向:植物免疫学。E-mail:susanluhui@163.com

伍冰倩(1994-),女,湖南衡阳人,在读硕士研究生,研究方向:免疫学。E-mail:13810471803@163.com。*共同第一作者

**通讯作者:赵 玳(1970-),女,安徽合肥人,教授,博士,主要从事免疫学研究。E-mail:hengzhao2000@gmail.com

及氢浴^[5]的形式作用于人体和动物模型,治疗包括帕金森病、糖尿病、神经损伤以及肾损伤等多种疾病^[6-8]。近年来的研究表明,H₂能够作为一种新型的信号分子参与植物胁迫应答^[9]。H₂能够缓解盐胁迫^[10],降低盐胁迫和百草枯造成的氧化损伤^[11];具有抗氧化、延缓植物衰老的作用^[12];能促使植物气孔关闭,增强植物耐旱能力^[13];缓解金属离子造成的氧化损伤^[14-15];诱导植物不定根的产生^[16-17];参与植物激素调控的抗病虫害信号途径^[18]。

番茄是研究果实采后生理与病理的一种经典模式材料^[19]。番茄灰霉病是由灰霉菌(*Botrytis cinerea*)引起的,灰霉病发病后传播速度很快,能造成严重的烂果现象,是影响番茄产量和品质的主要病害之一^[20-22]。本研究以采后番茄果实为试验材料,通过不同浓度HRW浸泡番茄果实,检测HRW对损伤接种番茄果实发病情况、病斑面积、多酚氧化酶(PPO)活性和一氧化氮(NO)含量的影响,研究H₂对番茄抗灰霉菌的作用效果,旨在探索利用小分子气体提高采后番茄果实抗真菌病害的新型方式,对提高番茄自身抗性、保护生态环境、提高经济效益具有十分重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

将番茄(*Solanum lycopersicum* vs. *Messina*)播种于山东滨州番茄种植基地大棚中,标记花期。采摘绿熟期(花期为45 d)番茄果实立即运至实验室,挑选大小均匀、无病虫害和伤痕的完好果实,置于(25±1)℃、相对湿度90%~95%的环境中释放田间热,次日进行处理。

1.2 方法

1.2.1 HRW的制备 参考林玉婷^[23]的方法,稍加改动。将H₂以150 mL/min的流速通入含5 L蒸馏水的广口瓶中持续4 h,即为饱和HRW。气相色谱测定表明,饱和HRW中H₂浓度为0.25 mmol/L,常温下该浓度能够保持12 h。之后立即用蒸馏水按不同体积比将HRW稀释至试验所需浓度。

1.2.2 番茄果实处理 参考Hu等^[12]的方法,稍加改动。将番茄果实浸泡在3%次氯酸钠溶液中2 min进行表面消毒,清水洗净后自然晾干。共设5组处理:蒸馏水对照、25% HRW、50% HRW、75% HRW、100% HRW。用不同浓度HRW浸泡番茄30 min后,取出晾干。

接种前,用枪头在番茄果实赤道部位扎2个宽2 mm、深4 mm的孔;取在PDA培养基上25℃培养7 d的番茄灰霉菌,在无菌条件下用无菌水(含0.01% Tween-80)配制成1×10⁶ cfu/mL的孢子悬浮液;向每个孔中注入10 μL孢子悬浮液。接种后,将果实置于(25±1)℃、相对湿度90%~95%的环境中。分别于0、3、6、9 d进行取样,每个处理分别取30个番茄果实,环灰霉病斑切取1 cm宽度未发病的果皮,并迅速切成小块,用液氮速冻后,保存于-80℃冰箱中。

1.2.3 指标测定 接种灰霉菌后0 d、3 d、6 d和9 d,各处理组随机选取10个番茄进行拍照,记录番茄果实发病情况。果实损伤病斑面积统计参考中方达^[24]的方法,于接种灰霉菌后的3 d、6 d和9 d共3个时间点(发病明显、病斑直径适宜统计)统计番茄果实病斑直径,每个处理重复3次,每次统计10个果实,病斑面积计算公式:病斑面积(mm²)=3.14×(病斑直径/2)²。PPO活性的测定参照Zauberman等^[25]的方法;组织内NO含量用一氧化氮试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

2 结果与分析

2.1 不同浓度HRW处理对番茄果实发病情况和病斑面积的影响

对照组番茄果实在接种灰霉菌后3 d开始出现明显病症,9 d发病状况明显,发病果实接种处可见边缘明显的辐射形水浸状病斑。接种灰霉菌后9 d,25% HRW处理组与对照组番茄果实的发病情况相近,与对照组相比,100% HRW处理组番茄果实的发病情况更明显,而50%和75% HRW处理明显降低了损伤接种番茄果实的发病情况(图1A)。此外,75%和100% HRW处理组的番茄果实成熟较为缓慢,变红程度低于对照组,表明H₂可能具有抗氧化、延缓果实衰老的作用。

从图1B可以看出,除100% HRW处理组接菌9 d番茄病斑面积较对照组高(为对照组的1.72倍)以外,25%、50%、75% HRW处理组病斑面积均较对照组降低,接菌9 d其病斑面积分别为对照组的84.4%、87.2%、77.9%。上述结果说明,HRW处理可在一定程度上增强番茄果实抗灰霉菌侵染的能力,综合发病情况,初步认为50%和75% HRW 2组处理对番茄果实的保护作用相对其他组更好,而100% HRW预处理则加重了病情。

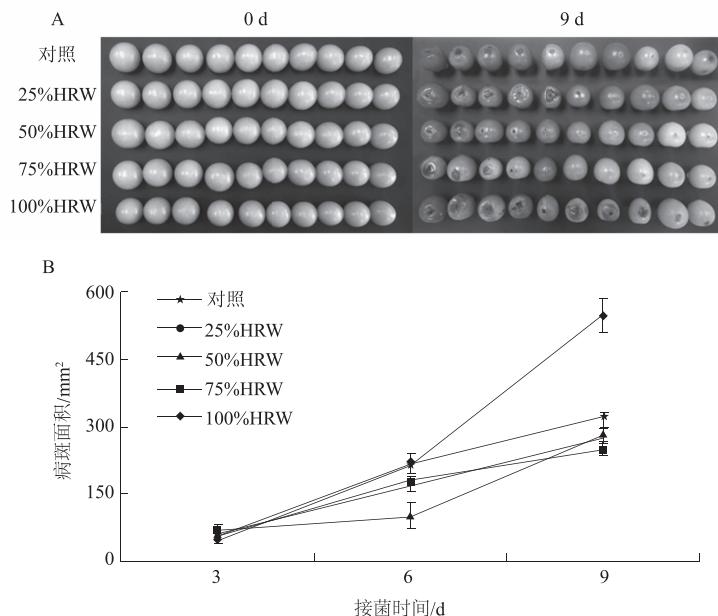
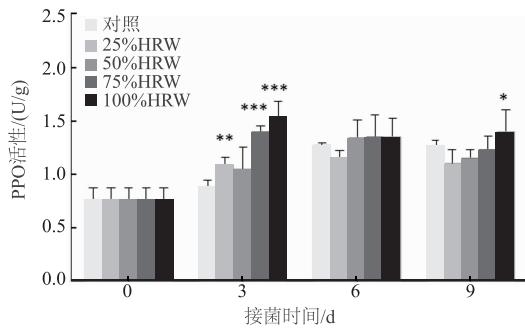


图 1 不同浓度 HRW 处理对接种后番茄果实发病情况(A)和病斑面积(B)的影响

2.2 不同浓度 HRW 处理对番茄果实 PPO 活性的影响

PPO 是与植物抗病性密切相关的酶, 它在植物的防卫反应中起着重要作用^[26]。从图 2 可以看出, HRW 处理可以不同程度地提高接菌后番茄果实的 PPO 活性。25%、50% 和 75% 3 个 HRW 处理组, 随接菌时间延长 PPO 活性整体表现出先增高后降低的趋势。25% HRW 处理组 PPO 活性仅在接菌后 3 d 高于对照组, 是对照组的 1.24 倍, 差异达到极显著水平($P < 0.01$) , 6 d 和 9 d 均低于对照组。50% 和 75% HRW 处理组番茄 PPO 活性在接菌后 3 d 和 6 d 均高于对照组, 两组处理在接菌后 3 d 的 PPO 活性分别是对照组的 1.19 倍和 1.59 倍, 其中, 75% HRW 处理组与对照组差异达到极显著水平($P < 0.001$) ; 接菌后 6 d 的 PPO 活性分别是对照组的 1.05 倍和 1.06 倍, 差异未达到显著水平; 接菌后 9 d 则



与对照组相比, * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$;
*** 表示 $P < 0.001$ 。下同

图 2 不同浓度 HRW 处理对接种后番茄果实 PPO 活性的影响

低于对照组。100% HRW 处理组番茄 PPO 活性始终高于对照组, 接菌后 3 d、6 d 和 9 d 分别是对照组的 1.74 倍、1.07 倍和 1.11 倍, 其中, 接菌后 3 d 差异达到极显著水平($P < 0.001$), 接菌后 9 d 差异达到显著水平($P < 0.05$)。

2.3 不同浓度 HRW 处理对番茄果实内源 NO 含量的影响

NO 在植物抗病防御反应和胁迫响应中具有至关重要的作用^[27-28], 能有效诱导采后番茄果实的抗病性^[29]。对接种灰霉菌后的番茄果实进行 NO 含量测定, 结果发现, HRW 处理提高了番茄体内的 NO 含量, 4 个处理组 NO 含量在接菌后 3 d、6 d 和 9 d 均高于对照组(图 3)。在接菌后 3 d, 25% 和 50% HRW 处理组 NO 含量分别是对照组的 2.24 倍和 2.56 倍, 25% HRW 处理组与对照组差异达到极显著水平($P < 0.01$), 50% HRW 处理组与对照组差异更为明显($P < 0.001$); 在接菌后 6 d, 25%、50%、75% HRW 处理组 NO 含量分别是对照组的 2.22、2.16、2.05 倍, 差异均达到显著水平($P < 0.05$); 在接菌后 9 d, 25%、50%、75% HRW 处理组 NO 含量分别是对照组的 2.30、3.13、1.40 倍, 其中, 25% HRW 处理组与对照组差异达到了显著水平($P < 0.05$), 50% HRW 处理组与对照组差异达到了极显著水平($P < 0.001$); 100% HRW 处理组 NO 含量在接菌后 3 d、6 d 和 9 d 均高于对照组, 但均未达到显著水平。以上结果表明, 在接种灰霉菌后, 50% HRW 组番茄果实 NO 含量升高程度较其他处理组

更明显。

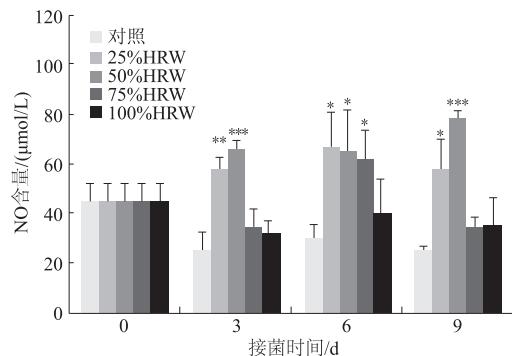


图3 不同浓度 HRW 处理对接种后番茄果实 NO 含量的影响

3 结论与讨论

H_2 作为一种重要的信号分子, 参与调节植物的多种非生物胁迫反应^[11,18,30], 能诱导植物产生对非生物胁迫的抗性, 如耐盐、抗百草枯、抗氧化胁迫、抗重金属等^[15]。Zeng 等^[18]以水稻和绿豆种子为试验材料, 通过不同浓度的 HRW 处理, 证明 H_2 作为抗氧化剂、种子萌发和植物胁迫反应中的信号分子等多种角色, 参与高等植物水杨酸、茉莉酸和乙烯等激素调控的抗病虫害信号途径; H_2 能调控植物激素受体基因的转录并促使抗氧化基因表达量上调; 植物能产生内源 H_2 , 其产量也受到茉莉酸和乙烯浓度的影响。

本研究以番茄果实为试验材料, 以 HRW 浸泡番茄果实的方式提供外源 H_2 , 通过损伤接种灰霉菌引发番茄果实的灰霉病, 研究 H_2 在采后番茄果实抗灰霉菌中的作用。结果显示, 25% HRW 处理组与对照组发病程度相似, 50% 和 75% HRW 处理明显降低了接种灰霉菌番茄果实的发病情况和病斑面积, 而 100% HRW 处理则加重了病情。PPO 参与植物体内酚类物质代谢, 它能将植物的酚类物质氧化成毒性更强的醌类物质, 毒杀病原菌并限制其扩散, 起到抗病的作用^[26]。因此, PPO 常作为植物抗病的重要生理指标之一。Li 等^[31]研究发现, 过表达 PPO 的转基因番茄具有更强的抵御病原菌侵染的能力。本研究发现, 接菌后 3 d 和 6 d, 与对照组相比, 50% 和 75% HRW 处理不同程度地提高了番茄果实的 PPO 活性。郑鄂燕^[22]发现, 外源 NO 处理能增强番茄果实的抗病性。本研究发现, 与对照组相比, 25% 和 50% HRW 处理在接菌后 3 d、6 d 和 9 d 可以不同程度地促进番茄果实内源 NO 含量增加, 差异均达到显著水平, 75% HRW 处理组在接菌后 6 d 番茄

果实内源 NO 含量也显著增加, 总体上 50% HRW 处理组番茄果实 NO 含量升高程度较其他处理组更明显。综上所述, 中等浓度的 HRW 处理 (50%、75%) 在一定程度上增强了番茄果实抗灰霉病侵染的能力, 低浓度的 HRW 处理 (25%) 没有起到保护作用, 而过高浓度的 HRW 处理 (100%) 不仅未提高番茄果实的抗病性, 而且可能增加灰霉菌对番茄果实的伤害。

与施用农药进行植物病害防治相比, 使用适当浓度的 HRW 处理植物提高其抗病能力是绿色环保、简单易行的。然而, 还需要进一步深入研究 H_2 如何参与植物抗病途径, 明确 H_2 作为信号分子在植物抗病途径中的作用机制。

参考文献:

- Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. Nature Medicine, 2007, 13(6): 688-694.
- Hong Y, Chen S, Zhang J M. Hydrogen as a selective antioxidant: A review of clinical and experimental studies [J]. Journal of International Medical Research, 2010, 38(6): 1893-1903.
- Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, et al. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome—An open label pilot study [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2010, 46(2): 140-149.
- Ohta S. Recent progress toward hydrogen medicine: Potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications [J]. Current Pharmaceutical Design, 2011, 17(22): 2241-2252.
- Shen M, Zhang H, Yu C, et al. A review of experimental studies of hydrogen as a new therapeutic agent in emergency and critical care medicine [J]. Medical Gas Research, 2014, 4(1): 1-8.
- Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, et al. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice [J]. Neuropharmacology, 2009, 50(2): 501-508.
- Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, et al. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice [J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2009, 64(4): 753-761.
- Fu G, Zhang L, Cui W, et al. Induction of heme oxygenase-1 with β -CD-hemin complex mitigates cadmium-in-

- duced oxidative damage in the roots of *Medicago sativa* [J]. *Plant and Soil*, 2011, 345(1/2):271-285.
- [9] 刘方, 刘勇波, 李俊生, 等. 氢气在植物抗胁迫中的作用[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(2):141-152.
- [10] Xu S, Zhu S, Jiang Y, et al. Hydrogen-rich water alleviates salt stress in rice during seed germination[J]. *Plant and Soil*, 2013, 370(1/2):47-57.
- [11] Xie Y, Mao Y, Lai D, et al. H₂ enhances *Arabidopsis* salt tolerance by manipulating ZAT10/12-mediated antioxidant defence and controlling sodium exclusion[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49800.
- [12] Hu H, Li P, Wang Y, et al. Hydrogen-rich water delays postharvest ripening and senescence of kiwifruit [J]. *Food Chemistry*, 2014, 156(11):100-109.
- [13] Xie Y, Mao Y, Zhang W, et al. Reactive oxygen species-dependent nitric oxide production contributes to hydrogen-promoted stomatal closure in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2014, 165(2):759-773.
- [14] Chen M, Cui W, Zhu K, et al. Hydrogen-rich water alleviates aluminum-induced inhibition of root elongation in alfalfa via decreasing nitric oxide production[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 267(1):40-47.
- [15] Cui W, Fang P, Zhu K, et al. Hydrogen-rich water confers plant tolerance to mercury toxicity in alfalfa seedlings[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 105:103-111.
- [16] Lin Y, Zhang W, Qi F, et al. Hydrogen-rich water regulates cucumber adventitious root development in a heme oxygenase-1/carbon monoxide-dependent manner [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(2):1-8.
- [17] 朱永超. 一氧化氮参与氢气诱导黄瓜和万寿菊不定根的发生[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [18] Zeng J, Zhang M, Sun X. Molecular hydrogen is involved in phytohormone signaling and stress responses in plants [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e71038.
- [19] 生吉萍, 罗云波, 申琳. 转反义 ACC 合成酶基因番茄与普通番茄果实植物内源激素含量的变化[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(3):43-48.
- [20] 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.
- [21] 樊平声, 沙国栋, 陈益芹, 等. 番茄灰霉病的防治研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(4):133-135.
- [22] 郑鄂燕. SIMPK1/2/3 在外源 NO 诱导的采后番茄果实抗病途径中的作用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [23] 林玉婷. HO - 1/CO 信号系统参与 H₂S、β - CD - hemin 和 H₂ 诱导的黄瓜不定根发生 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [24] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 北京农业出版社, 1998.
- [25] Zauberman G, Ronen R, Akerman M. Postharvest retention of the red color of litchi fruit pericarp [J]. *Scientia Horticulturae*, 1991, 47(1):89-97.
- [26] Mohammadi M, Kazemi H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum*, and induced resistance [J]. *Plant Science*, 2002, 162 (4): 491-498.
- [27] Camp W V, Montagu M V, Inzé D. H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance [J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(3):330-334.
- [28] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5 (5):388-395.
- [29] Fan B, Shen L, Liu K, et al. Interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in postharvest tomato resistance response to *Rhizopus nigricans* [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2008, 88 (7): 1238-1244.
- [30] Jin Q, Zhu K, Cui W, et al. Hydrogen gas acts as a novel bioactive molecule in enhancing plant tolerance to paraquat-induced oxidative stress via the modulation of heme oxygenase-1 signalling system[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2013, 36(5):956-969.
- [31] Li L, Steffens J C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance[J]. *Planta*, 2002, 215(2):239-247.