

接种枯萎病菌对甜瓜脂氧合酶活性及基因表达的影响

邵琪, 解群杰, 刘贺娟, 齐红岩*

沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110866

摘要: 本文研究薄皮甜瓜脂氧合酶(lipoxygenase, LOXs)及其基因家族成员(*CmLOXs*)在接种枯萎病后的响应。以薄皮甜瓜‘玉美人’幼苗为试材,“三叶一心”时,灌根法接种枯萎病菌-尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*),在接种后不同时间测定了幼苗电解质渗透率、根系活力、LOX活性及*CmLOXs*基因相对表达量。接种枯萎病菌后甜瓜叶片中有13个*CmLOXs*基因在接种枯萎病菌后上调表达。其中除*CmLOX02*和*CmLOX11*在第3天显著升高外,其他11个基因(*CmLOX03*、*CmLOX07*~*10*、*CmLOX12*~*17*)均在第5天时相对表达量达到最大值。甜瓜根部有5个*CmLOXs*基因上调表达,其中*CmLOX03*、*CmLOX16*和*CmLOX17*在处理1 d后有显著升高,*CmLOX05*和*CmLOX06*在接种3 d时与对照有显著差异。薄皮甜瓜幼苗在接种枯萎病菌时,根系活力显著下降,电解质渗透率升高,叶片和根中LOX活性升高,叶片和根中分别有13个和5个*CmLOXs*成员上调表达,但响应时间不同,这些结果表明*CmLOXs*可能参与防御反应,本研究为后续通过转基因技术研究其在生物胁迫中的作用奠定基础。

关键词: 薄皮甜瓜; 尖孢镰刀菌; 脂氧合酶活性; 基因表达

甜瓜属于葫芦科,甜瓜属,一年生蔓性草本植物,在我国有着悠久的栽培历史。近年来,随着设施栽培面积的扩大及连作等原因,设施甜瓜枯萎病发生频繁,严重影响甜瓜的产量和品质。脂氧合酶(lipoxygenase, LOXs, EC 1.13.11.12)又名脂肪氧化酶,是生物体内特别是高等植物中广泛存在的一类含有非血红素铁蛋白(Brash 1999; Porta和Rocha-Sosa 2002)。现已有大量研究表明,以亚油酸(linoleic acid, LA)和亚麻酸(linolenic acid, LeA)等不饱和脂肪酸为前体的LOX途径不仅通过下游的氢过氧化物裂解酶(hydroperoxidelyase, HPL)分支产生短链醛、醇,在抗逆中起作用,并且可以通过丙二烯氧合酶(allene oxide synthase, AOS)分支产生的茉莉酸类(jasmonic acid, JA)物质在抵御逆境胁迫中起作用(Feussner和Wasternack 2002; Prost等2005; Hu等2013)。因此,通过接种甜瓜枯萎病菌,研究LOX活性及其基因家族是否发生响应,进而深入研究甜瓜*CmLOXs*基因家族在感染枯萎病菌中的作用,对于提高甜瓜抗病能力有重要意义。

1932年在大豆中首次发现了LOX (Andre和Hou 1932),其催化含有顺,顺-1,4-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸加氧反应,从而形成具有共轭双键的脂肪酸氢过氧化物,后者普遍存在于动物、植物和真菌中(Brash 1999; Porta和Rocha-Sosa 2002; Liavonchanka和Feussner 2006)。已有研究表明,植物LOX蛋白分子量为94~104 kDa,是双加氧酶单体蛋白(Liavonchanka和Feussner 2006)。LOX启动

合成的一系列氢过氧化脂肪酸及其代谢产物统称为氧脂(oxylipins),它们在种子萌发(Feussner等2001)、块茎发育(Kolomiets等2001)、果实成熟(Chen等2004)、性别决定(Acosta等2009)、衰老(Seltmann等2010)及病菌防御(Wang等2008)中起重要作用。尤其在生物胁迫中,前人做了大量相关研究:在感染叶斑病的玉米中,*ZmLOX10*表达量升高(Christensen等2006);接种‘花壳’病毒后辣椒LOX活性显著升高(郑文字等2013);*CaLOX1*沉默的辣椒植株更易感染黄单胞菌叶斑病和炭疽病(Hwang和Hwang 2010);番茄感染叶霉病后*TomLoxD*明显升高(Hu等2015);受真菌侵染的葡萄*VvLOXO*转录水平显著升高(Podolyan等2010);受褐飞虱侵袭的水稻*OsLOX1*迅速积累(Wang等2008);受线虫侵染的豌豆*LOXN2*参与寄主抗性的后期机制(Veronico等2006)。可见,不同植物中LOXs成员在生物胁迫中发生的响应不同。

近年来,越来越多的植物:拟南芥(*AtLOX1*~*AtLOX6*)、番茄(*TomLoxA*~*TomLoxF*)以及猕猴桃(*AdLox1*~*AdLox6*)等成功鉴定和克隆出LOXs基因(Bannenberg等2009; Mariutto等2011; Zhang等2009),它们在生长发育过程中有不同的时空表达模式和生理功能。我们课题组已经从甜瓜基因组

收稿 2015-08-31 修定 2016-03-15

资助 国家自然科学基金(31272154)。

* 通讯作者(E-mail: hyqiaaa@126.com)。

数据库中搜索并鉴定出18个*CmLOXs*基因, 分别命名为*CmLOX01~CmLOX18* (Zhang等2014), 并且完成了时空表达模式等相关研究, 但是LOX基因家族各成员在生物胁迫中的作用及响应机制尚不明确(曹嵩晓等2014)。本研究通过接种枯萎病菌, 对LOX活性及*CmLOXs*进行实时荧光定量分析, 以期明确甜瓜*CmLOXs*基因家族成员对接种枯萎病菌的响应。另外, 参考了前人(李小玲等2015; 赵娟等2010)的研究结果, 认为病菌接菌后5 d内, 相对电导率、丙二醛及相关酶活性达到最大值, 这些研究只测定到病菌感染后的第5天数据, 所以本试验也只测定到接种后5 d各项指标的变化。本研究为进一步深入了解*CmLOXs*基因在生物胁迫中的作用机制, 提高甜瓜抗病能力有重要意义。

材料与方 法

1 试验材料与处理

以薄皮甜瓜(*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino) ‘玉美人’为试材, 2014年8~10月在沈阳农业大学园艺科研基地日光温室内进行。8月初, 进行温汤浸种, 催芽, 采用50孔穴盘基质育苗, 幼苗长至三叶一心时分苗至12 cm×13 cm的营养钵中, 缓苗1周后, 采用灌根法[每株10 mL, 浓度为 10^6 (个孢子)·mL⁻¹]对甜瓜苗接种枯萎病菌[尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl.), 菌株为单孢菌株JIE-4, 由沈阳农业大学植物保护学院提供], 分别于接种后第0、1、3和5天对甜瓜根部和叶片进行取样, 测定电解质渗透率、根系活力、LOX活性及*CmLOXs*基因相对表达量。

2 测定项目与方法

2.1 枯萎病菌孢子悬浮液的制备

PDA培养基的制备如下: 将马铃薯洗净去皮, 称取200 g, 切成小块。加水煮沸20 min后, 用纱布过滤装入1 000 mL的三角瓶中, 加入葡萄糖和琼脂粉各4 g, 充分溶解后加水定容到1 000 mL。然后在121°C下进行灭菌, 20 min后取出。在超净工作台上分装倒入培养皿中, 冷却后封口, 放入冰箱中备用。

尖孢镰刀菌孢子悬浮液的制备如下: 挑取小块保存于PDA培养基中的菌丝块, 接种到灭过菌的固体培养基中, 密封后在30°C烘箱中培养5~7 d,

用无菌水冲洗培养基, 以双层纱布过滤去菌丝, 将滤液浓度调整为 10^6 (个孢子)·mL⁻¹, 用于接种(刘朋义等2011)。

2.2 电解质渗透率

用天平准确称取洗净的根和叶各0.2 g (根和叶应尽量完整, 以消除伤口的影响), 处理和对照各进行3次重复, 加去离子水在室温条件下自然浸泡2 h, 摇匀后测定电导率, 然后再放入沸水中煮沸15 min, 冷却至室温后再测一次总电导率值, 参考赵世杰等(1998)文献。

直接用电导率值表示电解质外渗量, 根据公式: 电解质渗出率(%)=浸泡液电导率值/煮沸后电导率值×100。计算结果, 其中温度校正: $X_{25}=A_t[1+0.02(t-25)]$; X_{25} 为校正成25°C时的电导率, A_t 为在温度 t (°C)下实测电导率值。

2.3 根系活力

参考《现代植物生理学实验指南》(1999), 用TTC法测定, 四氮唑还原强度[$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$]=四氮唑还原量(mg)/[根重(g)×时间(h)]。

2.4 LOX酶活性

取0.5 g不同处理的叶片(根), 加50 μL 反应底物亚油酸($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、2.85 mL磷酸盐缓冲液(pH 6.8, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、100 μL 粗酶液至3 mL, 在室温下反应15 s开始在分光光度仪上测量在234 nm下的光密度值, 根据酶活性单位的定义, 以在25°C下, 每分钟增加1吸光度所需的活性作为甜瓜叶片脂氧合酶的1个活性单位(U) (陈巧等2013)。

2.5 *CmLOXs*的实时荧光定量表达(Real-time qPCR)分析

利用Real-time PCR分析甜瓜在接种枯萎病菌处理后叶片和根中18个LOX基因的表达情况(*CmLOX01~CmLOX18*), 以稀释后的cDNA为模板, 以甜瓜*18srRNA*基因作为内参基因, 实时定量PCR体系按照SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (Cat. FP205, 天根, 北京, 中国)试剂盒说明书进行。各引物序列参照Zhang等(2014)文献。Real time-PCR仪器为ABI PRISM7500荧光定量PCR仪。

3 数据处理

采用Origin 8.0软件进行数据处理, DPS进行统计分析, 差异显著性比较使用Duncan新复极差法($\alpha=0.05$)。

实验结果

1 接种枯萎病菌后甜瓜植株表型的变化

从图1可以看出, 接种后1~5 d中, 对照组长势良好, 而处理组随着接种时间的延长出现轻微萎蔫现象。第15天时, 子叶出现不均匀黄化, 萎蔫下垂, 根和茎基部腐烂变褐缢缩或呈立枯状, 植株萎蔫枯死, 表现出明显的枯萎病症状。

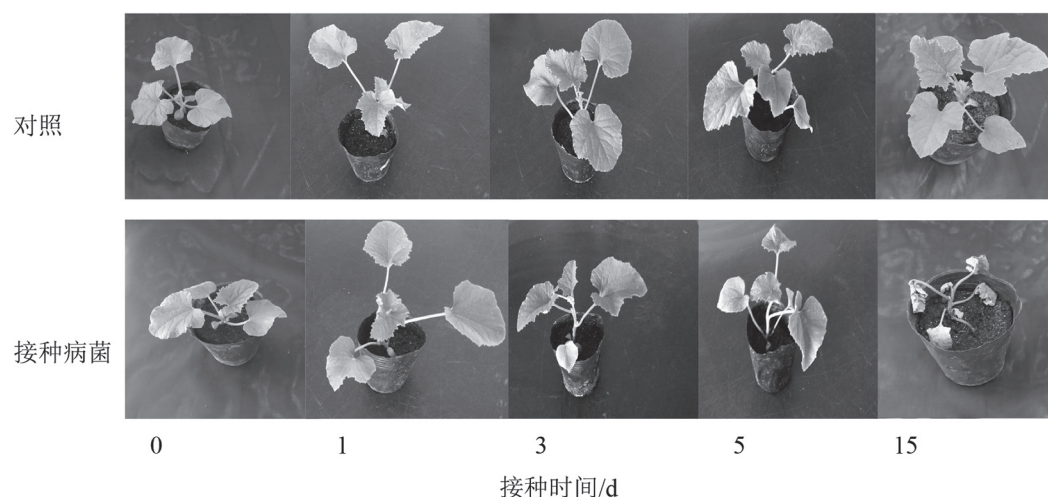


图1 接种枯萎病菌后甜瓜植株的变化

Fig.1 Changes of oriental melon seedlings after infecting with *fusarium oxysporum*

表1 接种枯萎病菌对甜瓜幼苗叶片和根中电解质渗透率、根系活力、LOX活性的影响

Table 1 Effects of *fusarium oxysporum* on electrolytic leakage ratio, roots vigor, LOX activities of leaves and roots in oriental melon seedlings

处理时间/d	电解质渗透率/%				根系活力/mg·g ⁻¹ (FW)·h ⁻¹		LOX活性/U·mg ⁻¹ (蛋白)			
	叶片		根		根		叶片		根	
	对照	病菌	对照	病菌	对照	病菌	对照	病菌	对照	病菌
0	18.82	18.63	40.30	40.20	24.94	24.60	26.30	25.76	28.06	28.49
1	19.66	20.67	40.41	42.17	25.31	22.12	28.10	29.99	26.76	28.25
3	19.82	22.67	40.82	43.53	25.35	20.93*	33.27	35.78	28.97	30.38*
5	19.39	28.59*	40.74	49.67*	25.95	13.13*	35.14	42.67*	27.85	32.97*

*表示同一时间不同处理间差异显著。下表同此。

接种枯萎病菌后根系活力与对照相比有显著差异, 明显下降, 并在第5天时最低, 表明甜瓜根部受到枯萎病菌侵染后根系活力下降。

接种枯萎病菌后, 甜瓜幼苗叶片和根部LOX活性升高, 第5天时上升到最大值, 与对照组差异显著。说明甜瓜幼苗在枯萎病菌侵染后, 均促进了叶片和根部LOX活性上调表达。

2 接种枯萎病菌后甜瓜叶片和根中电解质渗透率、根系活力及LOX酶活性的变化

从表1可以看出, 叶片和根中电解质渗透率先升高再下降趋势, 而接种后叶片和根中电解质渗透率均呈升高趋势, 并高于对照组。且接种后根部电导率值高于叶片, 在第5天达到最大值, 与对照差异显著, 甜瓜电解质渗透率的升高表明甜瓜受到枯萎病菌侵染。

3 接种枯萎病菌后甜瓜叶片和根中CmLOXs相对表达量的变化

3.1 甜瓜叶片中CmLOX01~LOX18相对表达量的变化

从图2可以看出, 接种枯萎病菌后, 甜瓜叶片中13个CmLOXs基因(CmLOX02、CmLOX03、CmLOX07~CmLOX17)均呈上调表达, 其中CmLOX02和

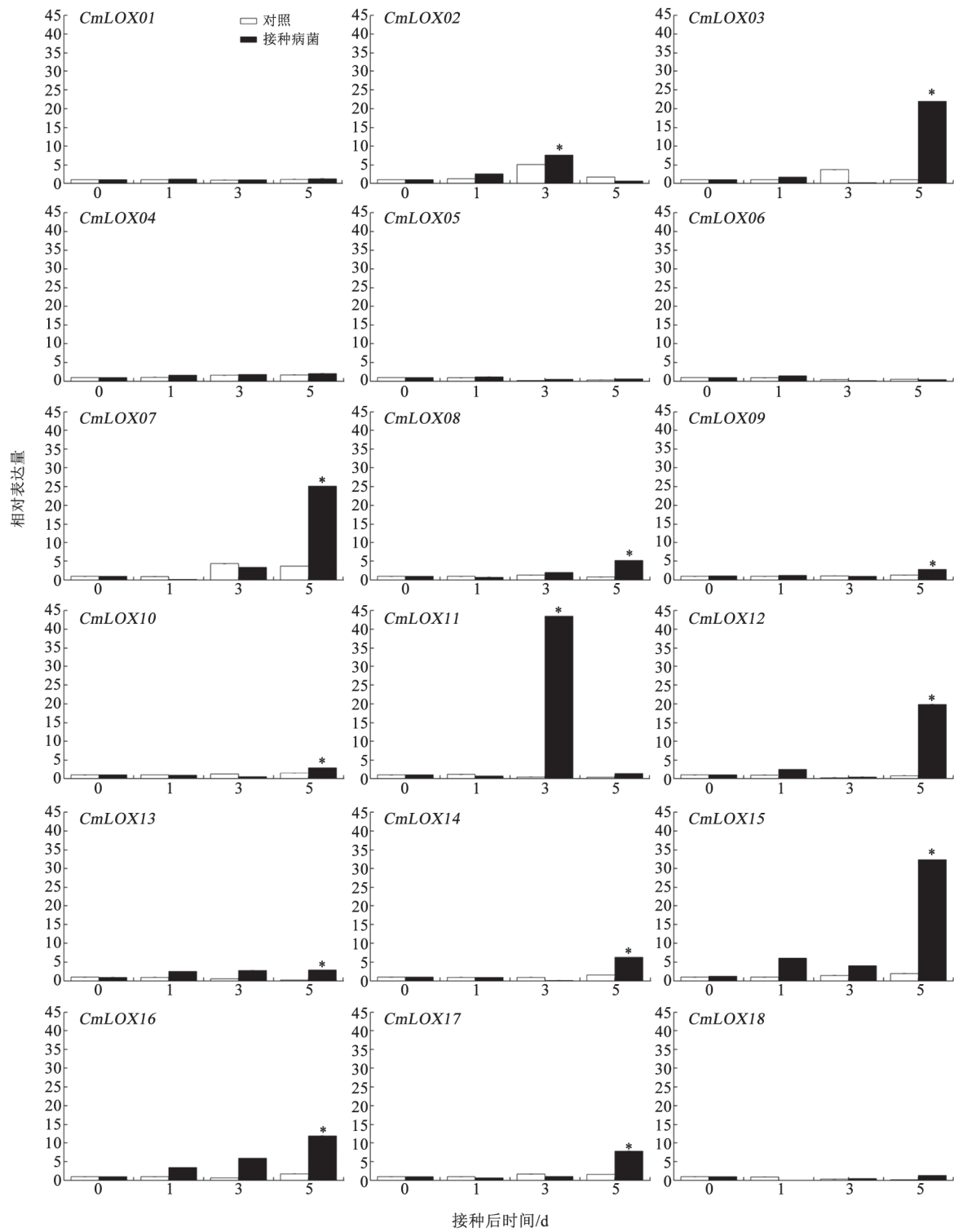


图2 接种枯萎病菌对甜瓜叶片CmLOX01~CmLOX18相对表达量的影响

Fig.2 Effects of *fusarium oxysporum* on CmLOX01–CmLOX18 relative expressions in oriental melon leaves

CmLOX11在第3天显著升高, CmLOX03、CmLOX07~10、CmLOX12~17在第5天时相对表达量最高。

在这13个上调表达的基因中, 有6个基因(CmLOX03、CmLOX07、CmLOX11、CmLOX12、Cm-

*LOX15*和*CmLOX16*)在接菌后表达量明显高于其他基因, 分别是对照的21倍、8倍、40倍、20倍、16倍和7倍, 推测这些基因可能响应或参与了甜瓜幼苗的防御机制, 在防御病原菌中起作用。

而其他5个基因(*CmLOX01*、*CmLOX04*、*CmLOX05*、*CmLOX06*和*CmLOX18*)则在接菌后没有响应或者表达量很低, 可能不参与防御反应。

3.2 接种枯萎病菌后甜瓜根部*LOX01*~*LOX18*相对表达量的变化

与叶片中大部分基因接菌后上调表达不同的是, 接种枯萎病菌后仅诱导了甜瓜根部的5个*CmLOXs*基因(*CmLOX03*、*CmLOX05*、*CmLOX06*、*CmLOX16*和*CmLOX17*)的表达, 并呈现不同的变化趋势(图3)。

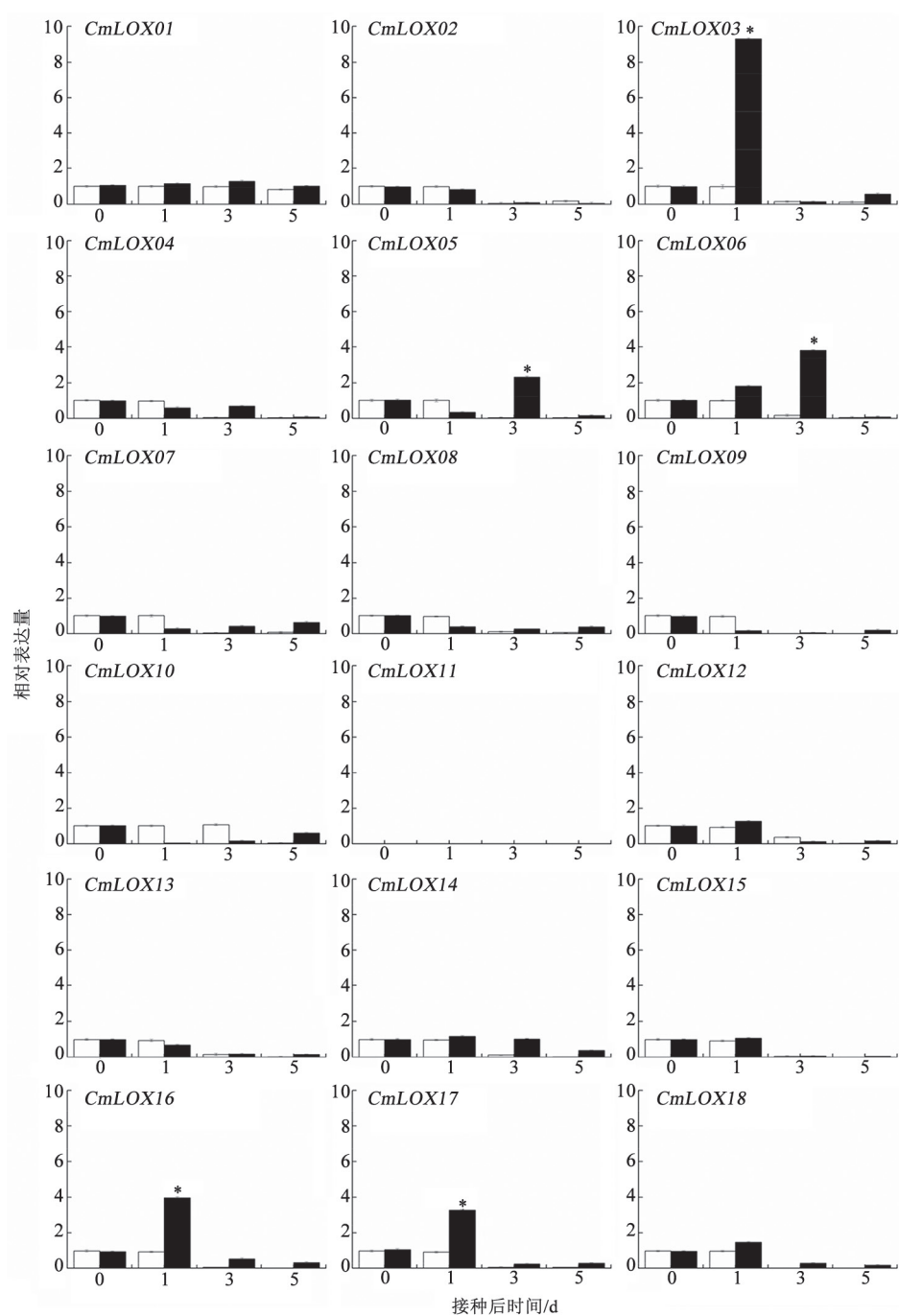


图3 接种枯萎病菌对甜瓜根部*CmLOX01*~*CmLOX18*相对表达量的影响

Fig.3 Effects of *fusarium oxysporum* on *CmLOX01*~*CmLOX18* relative expressions in oriental melon roots

其中, *CmLOX03*、*CmLOX16*和*CmLOX17*在接种1 d时表达量显著升高, 分别是对照组的9倍、4倍和3倍, 而*CmLOX05*和*CmLOX06*在接种3 d时上调表达。说明*CmLOXs*在接种枯萎病菌后, 叶片和根中表达存在时空差异。

18个*CmLOXs*基因中, *CmLOX05*和*CmLOX06*仅在根中受诱导而上调表达, *CmLOX02*、*CmLOX07~15*仅在叶片中受诱导而上调表达, 而接种后*CmLOX03*、*CmLOX16*和*CmLOX17*在叶片和根中均上调表达。

讨 论

本试验接种枯萎病菌后, 处理组植株叶片和根部的电解质渗透率与对照相比均上升, 并且在第5天达到显著差异, 表明生物胁迫会严重影响甜瓜植株的生长发育, 损伤膜系统。在接种褐腐病和轮纹病的梨果实愈伤组织中相对电导率持续增加, 膜系统遭到损失, 膜透性的变化与受害程度呈正相关(赵娟等2010)。本试验中甜瓜接种枯萎病菌后根系活力显著低于对照, 这与黄瓜感染枯萎病后根系活力明显下降的研究结果一致(黄奔立等2007)。本试验中这些生理指标变化表明甜瓜的确受到枯萎病菌的侵染, 为下一步测定LOX活性及基因表达提供基础。

已有研究表明, LOX在植物对病原体感染的防御反应中起关键作用。如玉米受大斑病菌侵染后, 能诱导LOX活性增加(张建成等2003)。黄瓜感染褐斑病后, 叶片中的LOX酶活性及JA含量都明显上升, 用LOX的专一抑制剂甲二氢愈创木酸(NDGA)喷施叶片后再接种褐斑病菌, 叶片中的LOX活性及JA含量明显降低, 植株更易感病, 而用NDGA处理后外加JA处理可以使植株的抗病性与正常植株一样, 这说明植株感染病原菌后LOX酶活性的增加会导致JA的积累, 促进抗病反应的发生(石延霞2008)。甜菜受黄脉坏死病毒(BNYVV)侵染后, 能显著提高甜菜根和叶内LOX活性, 进而影响JA的合成(白朕卿等2012)。本试验中接种枯萎病菌后导致的LOX活性升高, 是否会影响下游的JA含量, 进而起到防御作用, 是我们下一步要开展的工作。

有研究表明, 在番茄中, *TomLoxF*能够编码13-

LOX并被恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) BTP1激活(Mariutto等2011), 而感染叶霉病后*TomLoxD*明显升高(Hu等2013), *TomLOXD*沉默的转基因株系与野生型相比*TomLOXD*基因表达量下降, LOX酶活性降低, JA含量也随之降低, *TomLOXD*基因通过AOS支路产生茉莉酸进而在防御病原菌中起作用(Hu等2015)。在辣椒中, 有研究表明*CaLOX1*沉默的植株更易感染黄单胞菌叶斑病和炭疽病(Hwang和Hwang 2010); 而感染疫霉菌的辣椒中*CaLOX2*明显升高, 可能通过水杨酸和茉莉酸信号途径参与辣椒对疫霉菌等逆境条件的防卫反应(贾庆利等2012)。感染叶斑病的玉米叶片中*ZmLOX10*表达量升高(Nemchenko 2006), 玉米受食草动物侵袭后, *ZmLOX10*沉默突变体植株与野生型相比, 绿叶挥发物含量明显降低, *ZmLOX10*通过HPL支路产生绿叶挥发物GLV来抵御害虫侵害(Christensen等2013)。大白菜受根肿病侵染后LOX2升高, 主要通过JA途径参与抗病过程(韩之琪等2015)。

从以上国内外研究可以看出, 同一作物不同LOX家族成员对病原菌的响应不同。本试验中, 接种枯萎病菌后, 叶片和根中LOX基因家族成员表达存在时空差异, *CmLOX05*和*CmLOX06*仅在根中受诱导而上调表达, *CmLOX02*、*CmLOX07~15*仅在叶片中受诱导而上调表达, 而*CmLOX03*、*CmLOX16*和*CmLOX17*接种后, 叶片和根中均上调表达。推测这些基因可能在病原菌防御反应中起作用, 但具体是通过AOS还是HPL途径还有待进一步研究。

参考文献

- Acosta IF, Laparra H, Romero SP, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger JP, Moreno MA, Dellaporta SL (2009). *Tasselseed1* is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science*, 323 (5911): 262–265
- Andre E, Hou KW (1932). The presence of a lipid oxidase in soy bean, *Glycine soya*. *Lieb CR Acad Sci*, 194: 645–647
- Bai ZQ, Zhang SY, Shi LW, Chen YZ, Chen X (2012). The relationship between jasmonate and sugar beet resistance to Rhizomania. *Crops*, 04: 58–61 (in Chinese with English abstract) [白朕卿, 张少英, 石力伟, 陈玉珍, 陈旭(2012). 茉莉酸与甜菜抗丛根病的关系. *作物杂志*, 04: 58–61]
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44 (2): 85–95
- Brash AR (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis,

- and acquisition of substrate. *J Biol Chem*, 274 (34): 23679–3682
- Cao SX, Zang C, Tang YF, Qi HY (2014). Protein characteristic of the plant lipoxygenase and the function on fruit ripening and senescence and adversity stress. *Plant Physiol J*, 50 (8): 1096–1108 (in Chinese with English abstract) [曹嵩晓, 张冲, 汤雨凡, 齐红岩 (2014). 植物脂氧合酶蛋白特性及其在果实成熟衰老和逆境胁迫中的作用. *植物生理学报*, 50 (8): 1096–1108]
- Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z, Grierson D (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (*TomloxC*) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol*, 136 (1): 2641–2651
- Chen Q, Chen SX, Wang CY, Hao LN, Meng HW, Wan XH, Shen XQ, Chen ZH (2013). Cloning and expression analysis of lipoxygenase gene *CsLOX2* in *Cucumis sativus* (Cucumber). *Sci Agric Sin*, 46 (11): 2285–2297 (in Chinese with English abstract) [陈巧, 陈书霞, 王聪颖, 郝丽宁, 孟焕文, 万旭花, 申晓青, 程智慧 (2013). 黄瓜脂氧合酶基因*CsLOX2*的克隆及表达分析. *中国农业科学*, 46 (11): 2285–2297]
- Christensen SA, Nemchenko A, Borrego E, Murray I, Sobhy IS, Bosak L, DeBlasio S, Erb M, Robert CAM, Vaughn KA, et al (2013). The maize lipoxygenase, *ZmLOX10*, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. *Plant J*, 74: 59–73
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C (2001). Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci*, 6: 268–273
- Feussner I, Wasternack C (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 275–297
- Han ZQ, Xie XW, Jin ZW, Song JW, Chai AL, Shi YX, Li BJ (2015). Systemic resistance induced by Fluoro-substituted benzothiadiazole derivatives against *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage. *Acta Hort Sin*, 42 (4): 697–705 (in Chinese with English abstract) [韩之琪, 谢学文, 晋知文, 宋加伟, 柴阿丽, 石延霞, 李宝聚 (2015). 氟啶活化酯诱导大白菜抗根肿病效果与机理初步研究. *园艺学报*, 42 (4): 697–705]
- Hu T, Zeng H, Hu Z, QV X, Chen G (2013). Overexpression of the tomato 13-lipoxygenase gene *TomloxD* increases generation of endogenous jasmonic acid and resistance to *Cladosporium fulvum* and high temperature. *Plant Mol Biol Rep*, 31 (5): 1141–1149
- Hu TZ, Hu ZL, Zeng H, Qv XX, Chen GP (2015). Tomato lipoxygenase D involved in the biosynthesis of jasmonic acid and tolerance to abiotic and biotic stress in tomato. *Plant Biotechnol Rep*, 9: 37–45
- Huang BL, Xu YD, Wu Y, Zhang SQ, Chen XH (2007). Effects of root exudates from cucumber and squash on Fusarium wilt occurrence. *Chin J Appl Ecol*, 18 (03): 559–563 (in Chinese with English abstract) [黄奔立, 许云东, 伍焯, 张顺琦, 陈学好 (2007). 两个不同抗性黄瓜品种和云南黑籽南瓜根系分泌物对黄瓜枯萎病发生的影响. *应用生态学报*, 18 (03): 559–563]
- Hwang IS, Hwang BK (2010). The pepper 9-Lipoxygenase gene *CaLOX1* functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol*, 152: 948–967
- Jia QL, Gong ZH, Li DW (2012). Cloning and expression characterization of chloroplast-targeted 13-lipoxygenase gene (*CaLOX2*) in *Capsicum annuum* L. *J Agric Biotech*, 20 (10): 1126–1134 (in Chinese with English abstract) [贾庆利, 巩振辉, 李大伟 (2012). 辣椒定位于叶绿体的13-脂氧合酶基因(*CaLOX2*)克隆及表达分析. *农业生物技术学报*, 20 (10): 1126–1134]
- Kolomiets MV, Hannapel DJ, Chen H, Tymeson M, Gladon RJ (2001). Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell*, 13 (3): 613–626
- Li XL, Liu CM, Liu LH, Yang RP, Zheng JX, Mo YL, Wu MM, Zhang X (2015). Study on exogenous spermidine improving resistance to powdery mildew in melon seedlings. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*, 35 (9): 1800–1807 (in Chinese with English abstract) [李小玲, 刘长命, 刘炼红, 杨瑞平, 郑俊騫, 莫言玲, 吴梅梅, 张显 (2015). 外源亚精胺对甜瓜幼苗白粉病抗性的影响. *西北植物学报*, 35 (9): 1800–1807]
- Liavonchanka A, Feussner I (2006). Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Plant Physiol*, 163 (3): 348–357
- Liu PY, Bie ZL, Peng B, Gu QS (2011). Seedling stage test of melon resistance to *Fusarium* wilt. *China cucurb veget*, 24 (2): 11–13 (in Chinese with English abstract) [刘朋义, 别之龙, 彭斌, 古勤生 (2011). 甜瓜品种抗枯萎病的苗期鉴定. *中国瓜菜*, 24 (2): 11–13]
- Mariutto M, DUBY F, Adam A, Bureau C, Fauconnier ML, Ongena M, Thonart P, Dommes J (2011). The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biol*, 11: 29
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M (2006). Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J Exp Bot*, 57: 3767–3779
- Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C (2010). Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of *Sauvignon Blanc*. *Funct Plant Biol*, 37 (8): 767–784
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002). Plant lipoxygenases physiological and molecular features. *Plant Physiol*, 130 (1): 15–21
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé MT, Rosahl S, et al (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol*, 139 (4): 1902–1913
- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S (2010). Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 152 (4): 1940–1950
- Shanghai Institute of Plant Physiology, CAS (1999). Guide the Modern Plant Physiology Experiment. Beijing: Science Press, 303 (in Chinese with English abstract) [中国科学院上海植物生理研究所 (1999). 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 303]
- Shi YX, Yu Y, Fu JF Li BJ (2008). Relationship between LOX activity and JA accumulations in cucumber leaves induced by pathogen. *Acta Phytolacica Sin*, 35 (6): 486–490 (in Chinese with English abstract) [石延霞, 于洋, 傅俊范, 李宝聚 (2008). 病原菌诱导后黄瓜叶片中脂氧合酶活性与茉莉酸积累的关系. *植物保护学报*, 35 (6): 486–490]
- Veronico P, Giannino D, Melillo MT, Leone A, Reyes A, Kennedy

- MW, Bleve-Zacheo T (2006). A novel lipoxygenase in pea roots, its function in wounding and biotic stress. *Plant Physiol*, 141: 1045–1055
- Wang R, Shen W, Liu L, Jiang L, Liu Y, Su N, Wan J (2008). A novel lipoxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and responds to wounding and insect attack. *Plant Mol Biol*, 66 (4): 401–414
- Zhang B, Yin XR, Li X, Yang SL, Ferguson IB, Chen KS (2009). Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production. *J Agric Food Chem*, 57 (7): 2875–2881
- Zhang C, Jin YZ, Liu JY, Tang YF, Cao SX, Qi HY (2014). The phylogeny and expression profiles of the lipoxygenase (LOX) family genes in the melon (*Cucumis melo* L.) genome. *Sci Hortic*, 170: 94–102
- Zhang JC, Fan YS, Dong JG (2003). Effects of HT-toxin produced by *Exserohilum turcicum* on lipoxygenase activity in corn leaf cell. *Acta Phytopathol Sin*, 33 (5): 421–424 (in Chinese with English abstract) [张建成, 范永山, 董金皋(2003). 玉米大斑病菌毒素对玉米叶肉细胞脂氧合酶活性的影响. *植物病理学报*, 33 (05): 421–424]
- Zhao J, Zhang JS, Wang YG, Feng WX, Xu WX (2010). Effects of infection of epiphyte caused fruit rot on defense mechanism in pear fruit callus. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30 (11): 2219–2224 (in Chinese with English abstract) [赵娟, 张继澍, 王玉国, 冯文新, 许文秀(2010). 致病真菌侵染对梨果实愈伤组织防御机制的影响. *西北植物学报*, 30 (11): 2219–2224]
- Zhao SJ, Liu HS, Dong XC (1998). Experimental instruction of Plant Physiology. Beijing: Chinese Agricultural Science Press, 146–148 (in Chinese with English abstract) [赵世杰, 刘华山, 董心纯(1998). *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业科技出版社, 146–148]
- Zheng WY, Ding ZH, Liu H, Deng C, Xiao ZR (2013). Effect of pathogens causing discoloration on defensive system in red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiol J*, 49 (4): 357–361 (in Chinese with English abstract) [郑文字, 丁筑红, 刘海, 邓程, 肖治柔(2013). “花壳”病菌对辣椒防御系统的影响. *植物生理学报*, 49 (4): 357–361]

Effects of LOX activity and gene expression of *Cucumis melo* var. *makuwa* inoculated by *Fusarium oxysporum*

SHAO Qi, XIE Qun-Jie, LIU He-Juan, QI Hong-Yan*

Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: The effects of lipoxygenase (lipoxygenase, LOXs) and gene family members (*CmLOXs*) in the oriental melon inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* were studied. The oriental melon cultivar ‘Yumeiren’ were used as the experimental materials, they were inoculated with *Fusarium oxysporum* at the period of three leaves, then the conductivity, root vigor, LOX activity and real-time fluorescent quantitative PCR analysis of *CmLOXs* gene expressions were determined in different days. There were 13 *CmLOXs* up-regulated in leaves after inoculating with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*. *CmLOX02* and *CmLOX11* were significantly higher at 3 days after inoculation, while other 11 *CmLOXs* (*CmLOX03*, *CmLOX07–10*, *CmLOX12–17*) reached peak value at 5 days. Meanwhile, there were 5 *CmLOXs* up-regulated in roots after inoculation. *CmLOX03*, *CmLOX16* and *CmLOX17* were significantly increased at 1 days, *CmLOX05* and *CmLOX06* were significantly higher than the control at 3 days. In addition, LOX activity and conductivity in leaves and roots increased, while root vigor decreased when melon seedlings infected *Fusarium oxysporum*. The results suggested that LOX gene family might participate in response and will be helpful in transgenic experiment to understand their precise roles of melon in biotic stress.

Key word: oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa*); *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*; LOX activity; gene expression

Received 2015-08-31 Accepted 2016-03-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31272154).

*Corresponding author (E-mail: hyqiaaa@126.com).