

BHT对苹果果实轮纹病的防效及防御酶活性的影响

于春蕾, 孟璐璐, 练森, 李保华, 梁文星, 王彩霞*

青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 以‘富士’苹果果实为材料, 采用刺伤接种法, 测定了2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)对苹果果实轮纹病的防效及其防病机制。结果表明: 0.1 mmol·L⁻¹的BHT处理后间隔48~72 h接种轮纹病菌, 其防效最高达74%以上, 而该浓度BHT对轮纹病菌菌丝生长和分生孢子萌发均无明显的抑制作用。BHT处理后接种或不接种轮纹病菌, 果实内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性以及总抗氧化能力(T-AOC)均显著升高, 其峰值是对照的1.82~4.56倍, 且在测定时间内始终显著高于对照。同时, BHT处理的果实内丙二醛(MDA)含量变化较小, 最高增幅仅为78.94%, 而接种轮纹病菌的处理, MDA含量急速上升, 最大增幅为316.77%。表明BHT通过持续提高‘富士’果实内防御酶活性和总抗氧化能力, 同时降低膜脂过氧化产物MDA的积累, 从而诱导果实对轮纹病的抗性。

关键词: BHT; 果实轮纹病; 诱导抗性; 防御酶; 丙二醛

由葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)引起的苹果轮纹病是一种世界性病害, 我国各苹果产区均有分布, 其中多雨潮湿的环渤海湾和黄河故道产区受害严重(国立耘等2009)。苹果轮纹病主要危害枝干和果实, 不仅严重削弱树势, 导致幼树和枝条干枯死亡, 并能释放大量孢子侵染果实, 引发果实轮纹病造成烂果(李保华等2013; 任洁等2014)。轮纹病菌在5月份即可侵入苹果幼果, 近成熟期大量发病, 由于病菌潜伏期长, 在苹果储藏和运输过程中均可造成烂果, 也是重要的储藏期病害(Tang等2012; 雍道敬等2014)。目前, 我国主栽的‘富士’、‘红星’、‘乔纳金’等苹果品种均对轮纹病菌非常敏感(杨丽丽等2012)。一般年份轮纹病烂果率均在5%以上, 2013年对山东省苹果产区调查发现, 部分果园套袋苹果轮纹烂果率为20%~30%, 重病果园烂果率高达70%以上(雍道敬等2014)。有效控制果实轮纹病对于提高苹果果品质量及采后贮藏保鲜具有重要意义。

目前, 生产上对苹果枝干轮纹病的防治主要依靠化学药剂, 果实轮纹病以套袋保护为主, 由于苹果套袋成本逐年上涨, 苹果的无袋栽培已成为必然趋势, 但是果实轮纹病是苹果无袋栽培首先要解决的关键问题(张高雷等2010; 李保华等2013)。苹果采后果实轮纹病的防治也主要依靠化学药剂浸泡果实的方法, 但是化学杀菌剂的药剂残留、病原菌易对其产生抗性和环境污染严重等问题已日趋严重(Colgan和Johnson 1998; 纪兆林等2008; 成

世杰等2017)。因此, 寻求可替代化学杀菌剂的安全有效防治措施已成为苹果轮纹病防治中亟待解决的问题。

本课题组鉴定了一株苹果内生放线菌, 娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) A-1, 雍道敬等(2014)和Zhang等(2016)研究发现, 菌株A-1能诱导苹果防御酶活性的提高和病程相关蛋白基因的上调表达, 以抵抗轮纹病菌对果实的侵染。此外, 菌株A-1还能诱导苹果对炭疽叶枯病的抗性, 为该病害防治提供了新途径(朱学明等2015)。马林等(2008)从辣椒根部获得一株娄彻氏链霉菌Lj20, 发现其代谢产物中含有一种化合物2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT); 随后, 关晔晴等(2011)证实BHT对梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)等具有抑制作用。BHT是一种抗氧化剂, 广泛用于石油化工及食品工业(李赤翎等2009; 张智力等2017), 其对苹果轮纹病的防治效果及防病机制尚未见报道。

本研究以‘富士’果实为材料, 采用刺伤接种法, 测定BHT对果实轮纹病的防治效果, 及经BHT处理后果实内防御性酶活性和丙二醛(malondiade-

收稿 2018-03-01 修定 2018-05-08

资助 山东省重点研发计划(2017CXGC0214)、现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-28)、国家重点研发计划(2016-YFD0201122)、山东省“泰山学者”建设工程专项和青岛农业大学研究生创新立项(QYC201716)。

* 通讯作者(cxwang@qau.edu.cn)。

hyde, MDA)含量的时序变化,以期明确BHT对苹果果实轮纹病的防效及其防病机制,为BHT在农业生产中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试苹果为健康成熟‘富士’(*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji),采集自山东莱阳商品苹果园,选择大小一致的健康果实于低温保存备用。苹果轮纹病菌[*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. et de Not.]菌株LXS030101单孢分离后于本实验室保存(程自振等2013)。BHT购买自Sigma公司,酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究有限公司。

轮纹病菌LXS030101的培养采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯200.0 g、葡萄糖20.0 g、琼脂20.0 g,蒸馏水定容至1 000 mL。

1.2 方 法

1.2.1 轮纹病菌孢子悬浮液的制备

轮纹病菌LXS030101由本实验室分离并保存,于PDA平板上活化培养,待菌落生长至平板面积的2/3时,在菌落边缘打取直径5 mm的菌饼,接种于苹果幼果诱导产孢(冷伟锋等2009)。用血球计数板将分生孢子浓度调整为 10^6 个·mL⁻¹。

1.2.2 不同浓度BHT对果实轮纹病的防效

挑选大小一致、健康的‘富士’苹果,75%酒精表面消毒后,用无菌接种针沿苹果赤道造成3~4处伤口(曹晶晶等2017)。待伤口晾干后分别滴入20 μL不同浓度的BHT溶液(0.05~1.0 mmol·L⁻¹),以无菌水处理作对照。于25°C恒温处理72 h后,每伤口接种活化的轮纹病菌菌饼。接种后果实置于25°C,密封保鲜盒中,每隔24 h观察果实发病情况,测量病斑直径,计算病斑面积和防治效果。防治效果=(对照组病斑面积-处理组病斑面积)/对照组病斑面积×100%。

选取最佳防治效果的BHT浓度,于BHT处理后不同时间(6、12、24、48、72和96 h),接种轮纹病菌菌饼。每隔24 h观察果实发病和病斑扩展情况,测定病斑面积并计算防治效果,确定BHT的最佳处理时间。每处理接种3个果实,以上试验重复3次。

1.2.3 BHT对轮纹病菌孢子萌发和菌丝生长的影响

采用玻片法观察BHT对轮纹病菌孢子萌发的影响(王彩霞等2012),用不同浓度(0.1~1.0 mmol·L⁻¹) BHT将孢子悬浮液稀释至 10^6 个·mL⁻¹,各取30 μL滴在凹玻片中央,并置于铺有湿滤纸的培养皿中于25°C恒温保湿,以不加BHT的孢子悬浮液作对照。每隔12 h显微镜下观察孢子萌发情况,每处理5个玻片。

采用平板法测定BHT对轮纹病菌菌丝生长的影响,制备含不同浓度BHT的PDA平板,接种活化的轮纹病菌菌饼,以未加BHT的PDA作对照。于25°C恒温培养,定期测量菌落直径,每处理接种3个平皿。

1.2.4 BHT处理后果实内MDA含量、防御酶活性和总抗氧化能力测定

按1.2.2节中方法选取苹果后,将其分别进行如下处理,方法参照曹晶晶等(2017)的报道。(1)无菌水处理作对照(Control);(2) BHT处理;(3)接种轮纹病菌(Pathogen);(4) BHT处理48 h后接种轮纹病菌(BHT+Pathogen)。每组处理接种12个苹果,每个果实刺伤3~4个点,接种病原菌后定期观察发病情况,以接种点为中心取周围2 cm范围内或病健交界处果肉组织,于-80°C冰箱保存备用(Zhang等2016)。每处理随机选取2个果实,至少2个接种点的混合样作为1个重复。以上试验重复3次。

取1.0 g果肉组织液氮充分研磨后,用4 mL 10%三氯乙酸溶液提取MDA,采用硫代巴比妥酸比色法测定MDA含量(王彩霞等2014)。防御酶活性测定粗酶液的制备,取1.0 g果肉组织,研磨后加入4 mL含1% PVP的0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 5.5~8.8),于4°C、10 000×g离心20 min,所得上清液即为酶粗提取液。用南京建成试剂盒测定过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,测定方法分别为愈创木酚法、钼酸铵法和黄嘌呤氧化酶法;总抗氧化能力(T-AOC)测定采用比色法。酶活性和MDA含量以每克果肉组织鲜重表示[U·g⁻¹ (FW)或μmol·g⁻¹ (FW)]。

1.2.5 数据分析

采用Microsoft Excel 2010作图,用SPSS 19.0软件进行数据统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 实验结果

2.1 BHT对苹果果实轮纹病的防效

2.1.1 BHT浓度对防治轮纹病效果的影响

BHT处理可明显降低果实轮纹病的病斑面积(图1-A), 但不同浓度BHT对轮纹病的防治效果存在显著差异(图1-B)。接种轮纹病菌3 d时, 浓度0.5 mmol·L⁻¹的BHT防效最差为39.44%, 0.05和0.2 mmol·L⁻¹的BHT防效相当, 而0.1 mmol·L⁻¹的BHT的防效达82.73%, 显著高于其他4个浓度处理。随接种时间延长, 各处理果实病斑均有不同程度的扩展, 但仅0.2 mmol·L⁻¹的BHT防效略有降低, 其他4个浓度BHT接种后5 d时防效与3 d时均无显著差异。

2.1.2 间隔时间对BHT防治果实轮纹病效果的影响

选择防治效果最佳的BHT浓度0.1 mmol·L⁻¹, 测定了BHT处理不同间隔时间对果实轮纹的防效。图2结果显示, 间隔时间在6~48 h内, 随间隔时间延长, 对轮纹病的防效逐渐升高, 但随接种病原菌时间的延长, 其防效没有显著变化。BHT处理后间隔6~12 h接种轮纹病菌, 其防效较低均不足14%, 间隔48 h的处理, 其防效最高, 接种后3 d和5 d时防效均在74%以上, 间隔72 h的处理其防效与

之相当。间隔时间为96 h时, 其对轮纹病的防效明显降低, 但显著高于间隔时间6~24 h的处理。

2.2 BHT对轮纹病菌孢子萌发和菌丝生长的影响

轮纹病菌对照分生孢子萌发率为86.83%, 添加不同浓度BHT后, 与对照相比, 孢子萌发率均无显著差异(图3-A)。利用平板法测定了不同浓度BHT对轮纹病菌菌丝生长的影响, 图3-B结果显示, 添加较低浓度(0.1~0.5 mmol·L⁻¹) BHT的PDA平板上菌落直径均在6.37 cm以上, 与不添加BHT的对照没有显著差异, 而1.0 mmol·L⁻¹的BHT对轮纹病菌菌丝生长有明显的抑制作用, 其菌落直径仅为3.80 cm。以上结果表明, 0.1~0.5 mmol·L⁻¹的BHT对轮纹病菌孢子萌发和菌丝生长均无明显的抑制作用。

2.3 BHT处理对苹果果实内防御酶活性和T-AOC的影响

2.3.1 POD、CAT和SOD防御酶活性

‘富士’果实经无菌水处理后, POD活性无明显变化, 而其他3个处理酶活性均不同程度升高(图4-A)。接种轮纹病菌2 d后, POD活性开始显著升高, 于接种后3 d达到峰值, 是对照酶活性的2.64倍, 随后酶活性水平快速降低至对照水平。BHT单独

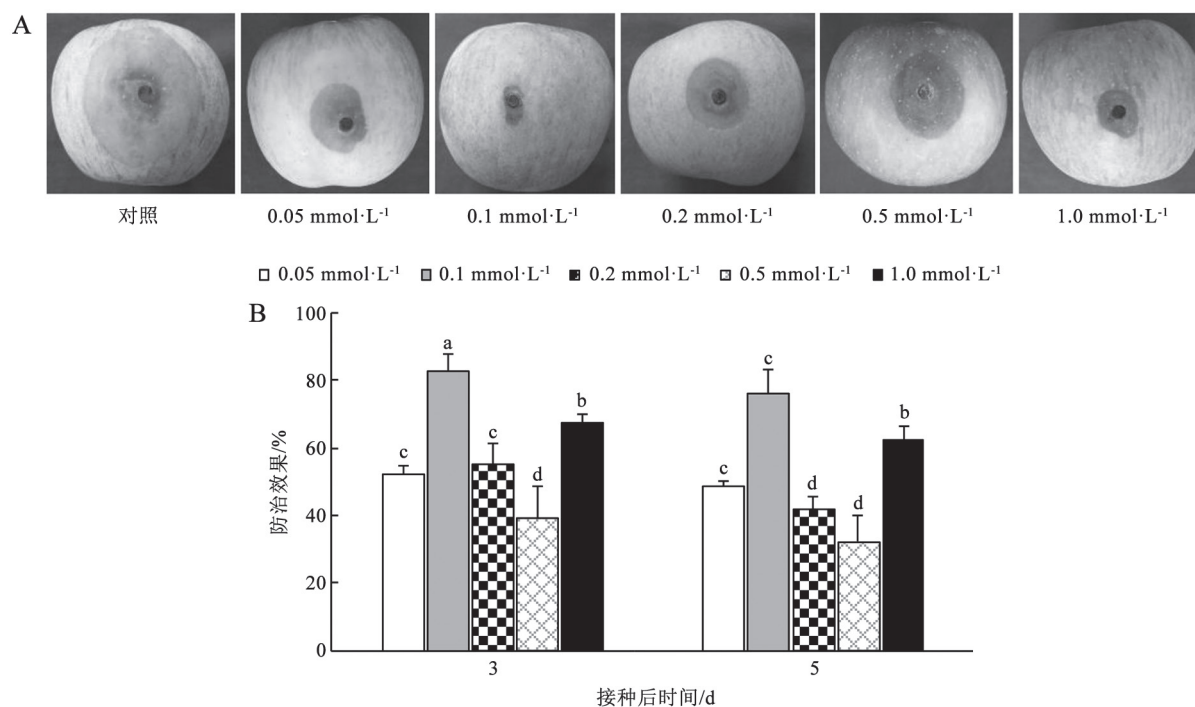


图1 不同浓度BHT对果实轮纹病的防治效果

Fig.1 Control efficiency of BHT at different concentrations against *B. dothidea* in apple fruit

图中不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著, 图2和3同此。

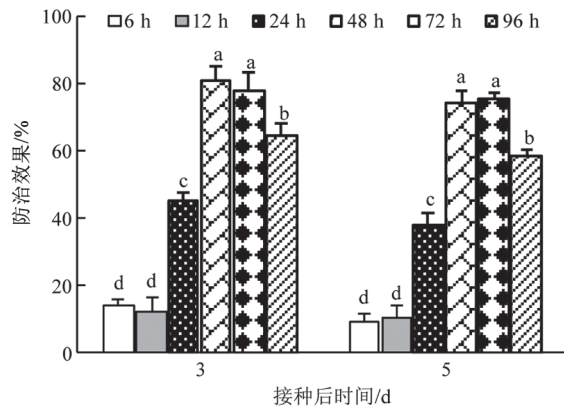


图2 BHT处理不同间隔时间对果实轮纹病的防治效果
Fig.2 Control efficiency of BHT with different treatment time against *B. dothidea* in apple fruit

处理和BHT处理后再接种轮纹病菌的处理,于12 h后POD活性开始显著升高,于2 d后到达活性高峰,分别为对照的3.65倍和4.56倍,随后酶活性略有降低,但始终显著高于对照。

由图4-B可见,相比对照,各处理均显著提高了果实内CAT活性, BHT处理后1 d, CAT活性已达峰值为对照的2.03倍,随后酶活性快速降低,但始终显著高于对照。接种轮纹病菌的处理, CAT活性于接种后2 d达到高峰,为对照的1.44倍,随后酶活性急剧下降至对照水平; BHT处理后再接种病原菌的处理,酶活性于接种后12 h即达到高峰,为对照的2.19倍,随后酶活性虽略有降低始终维持在较高水平。

各处理果实内SOD活性相比对照均显著升高,但不同处理诱导的酶活性变化趋势存在明显差异

(图4-C)。接种轮纹病菌的处理, SOD活性变化趋势与CAT和POD类似,呈现先升高后降低的单峰曲线,接种后3 d达到峰值 $5.49 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),随后酶活性快速降低至对照水平。BHT处理后1 d, SOD活性开始显著升高,于2 d时达到活性高峰,为 $8.56 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。BHT处理后再接种轮纹病菌的处理,于1 d后即达到活性高峰为 $13.36 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),随后酶活性有所降低,但始终维持在较高水平。上述结果表明, BHT处理可显著提高‘富士’果实内抗氧化酶活性水平。

2.3.2 T-AOC测定

无菌水处理对照果实中T-AOC无明显变化,但其他3个处理均有不同程度升高(图4-D)。接种轮纹病菌的处理,接种后2 d时T-AOC开始显著升高并到达峰值,为对照的1.35倍,但随后T-AOC水平快速下降,接种后5 d时降低至对照水平。BHT处理后12 h, T-AOC已显著升高,于接种后3 d达到峰值,是对照的1.82倍; BHT处理后再接种轮纹病菌的处理, T-AOC呈现先升高后降低再升高的双峰曲线,于接种后3 d到达最高峰,是对照的2.13倍,随后T-AOC略有降低,但始终维持在较高水平。由此可见, BHT处理可以显著提高果实的总抗氧化能力。

2.4 BHT处理对苹果果实内MDA含量的影响

如图5所示,无菌水对照和BHT处理的苹果果实, MDA含量没有明显变化;接种轮纹病菌和BHT处理后再接种轮纹病菌的果实中MDA含量呈现上升趋势,但增加速率存在显著差异。接种轮纹病菌后2 d, MDA含量相比对照开始显著升高,接种后5 d时,达到高峰 $14.39 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),增幅高达316.77%。BHT处理后再接种轮纹病菌,果实内MDA含量于

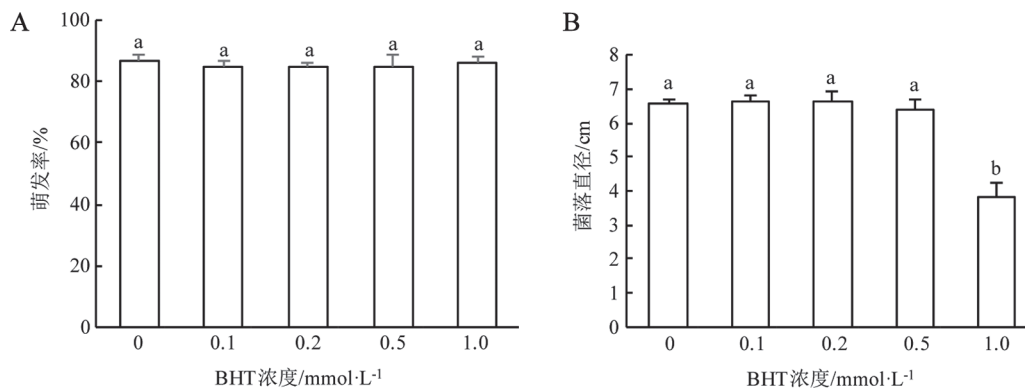


图3 不同浓度BHT对轮纹病菌孢子萌发(A)和菌丝生长(B)的影响
Fig.3 Effect of BHT at different concentrations on conidial germination (A) and mycelial growth (B) of *B. dothidea*

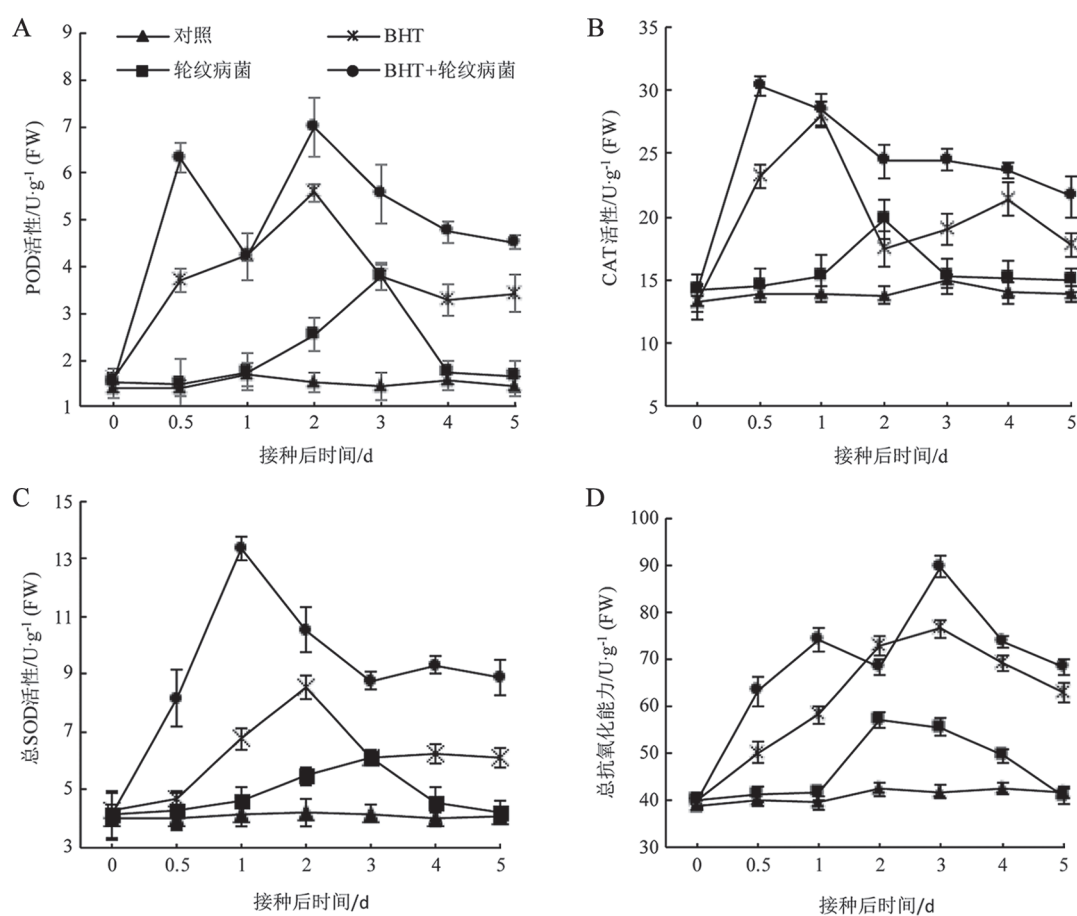


图4 BHT处理对苹果果实中POD、CAT、SOD活性和T-AOC的影响

Fig.4 Effect of BHT treatment on POD, CAT, SOD activities and T-AOC in apple fruit

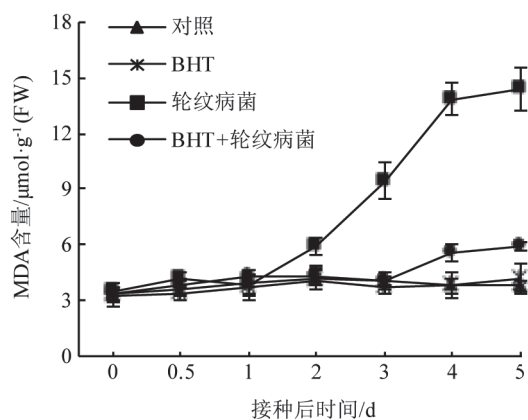


图5 BHT处理对苹果果实中MDA含量的影响

Fig.5 Effects of BHT treatment on and MDA content

接种后4 d才开始显著升高, 接种后5 d时到达高峰 $5.93 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 增幅仅为78.94%。由此表明, BHT处理能显著降低轮纹病菌对果实细胞膜的损害, 避免膜脂过氧化物的发生。

3 讨论

2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)是一种工业应用非常广泛的抗氧化剂(张智力等2017), 虽已发现高浓度BHT对多种植物病原真菌有抑制作用(关晔晴等2011), 但尚未见应用于植物病害防治的报道。本研究结果表明, BHT对苹果果实轮纹病具有显著的防治效果, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BHT处理后间隔48~72 h接种轮纹病菌, 防效高达74%以上。防病机制研究发现, $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BHT对轮纹病菌菌丝生长有明显抑制作用, 与关晔晴等(2011)研究结果一致。 $0.1\sim 0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BHT对轮纹病菌菌丝生长和分生孢子萌发均无明显的抑制作用, 但可显著提高果实内防御酶活性和总抗氧化能力, 并能抑制MDA的积累。表明低浓度BHT对果实轮纹病的防效不是通过抑菌作用, 而是通过诱导果实抗病性实现的, 具有巨大的应用潜能。

诸多研究表明,植物受到病原菌侵染后,活性氧的积累与其抗病性密切相关,但活性氧代谢失调或过量积累也可导致细胞膜过氧化,甚至整个膜系统遭受破坏(Wang等2014; Zhang等2016)。POD、SOD和CAT是植物机体内源活性氧清除剂,具有清除自由基,维持植物体内活性氧平衡的重要作用(朱学明等2015)。此外,POD还参与木质素的合成,其活性升高有利于细胞壁木质化从而阻止病原菌的侵入和扩展(Zhang等2014)。Zhang等(2016)研究发现,萎彻氏链霉菌A-1代谢物处理果实后,3种防御酶均被诱导,从而提高了苹果对轮纹病的抗性。本研究中,单一化合物BHT处理也能显著提高果实内3种酶活性,而BHT处理后再接种轮纹病菌,酶活性升高更显著,且始终维持在较高水平。仅接种轮纹病菌的处理,酶活性增幅较小,且到达峰值后急速降低至对照水平。结合BHT对轮纹病的防效结果,接种后3 d和5 d防效相当。表明BHT可通过持续提高果实内POD、SOD和CAT活性,维持其活性氧代谢平衡,从而诱导果实的抗病性。

植物防御体系有酶促和非酶促两种,上述3种防御酶属于前者,总抗氧化能力能够很好地反应植物体内防御系统抗氧化能力的强弱程度(刘磊等2015)。研究发现,接种轮纹病菌的处理,T-AOC于2 d后才开始升高,随后降低至对照水平;而BHT处理后12 h, T-AOC即开始升高,且始终维持在较高水平。这与Zhang等(2016)利用萎彻氏链霉菌A-1代谢物诱导苹果果实抵抗轮纹病菌侵染的研究结果一致。

MDA是脂质过氧化的一个重要指标,其积累量可反映植物遭受损害的程度(Draper和Hadley 1990; Kuk等2003)。本研究中,接种轮纹病菌的处理,MDA含量从接种后2 d开始快速上升,最高增幅达316.77%,而BHT处理后再接种病原菌,MDA含量于4 d后才开始升高,且增幅较小,表明BHT可有效地降低MDA的积累,减轻轮纹病菌侵染对果实造成的伤害,从而维持细胞膜的完整性。

综上所述,BHT对苹果果实轮纹病具有显著的防治效果,其防病机制与抑菌作用无关,而是与诱导果实内防御酶活性的时序变化、提高总抗氧化能力及降低细胞膜脂过氧化等密切相关。可见,BHT在植物病害防治中有巨大的应用潜能,且具

有防病谱广、不污染环境等优点,符合现代农业减少农药使用量,降低食品农药残留的发展战略。因此,BHT诱导苹果抗病的分子机制值得进一步深入研究。

参考文献(References)

- Cao JJ, Yu ZC, Zhang Y, et al (2017). Control efficiency of exogenous melatonin against postharvest apple grey mold and its influence on the activity of defensive enzymes. *Plant Physiol J*, 53 (9): 1753–1760 (in Chinese with English abstract) [曹晶晶, 于子超, 张颖等(2017). 外源褪黑素对苹果采后灰霉病的防效及防御酶活性的影响. *植物生理学报*, 53 (9): 1753–1760]
- Cheng SJ, Fan K, Zhang BB, et al (2017). The sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to thiophanate-methyl, captan and metiram. *J Fruit Sci*, 34 (12): 1590–1598 (in Chinese with English abstract) [成世杰, 范昆, 张彬彬等(2017). 苹果轮纹病菌对甲基硫菌灵、克菌丹和代森联的敏感性. *果树学报*, 34 (12): 1590–1598]
- Cheng ZZ, Zhao X, Dong XL, et al (2013). Resistance of apple branches at different ages to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Protect*, 39 (1): 137–140 (in Chinese with English abstract) [程自振, 赵旭, 董向丽等(2013). 不同龄期枝条对苹果轮纹病菌的抗病性研究. *植物保护*, 39 (1): 137–140]
- Colgan J, Johnson DS (1998). The effects of postharvest application of surface sterilizing agents on the incidence of fungal rots in stored apples and pears. *J Hort Sci*, 73 (3): 361–366
- Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186: 421–431
- Guan YQ, Chen HB, Zhang BJ, et al (2011). Study on the inhibition effect of BHT on six kinds of plant pathogenic fungi. *J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Edn)*, 31 (1): 47–49 (in Chinese with English abstract) [关晔晴, 陈红兵, 张宝俊等(2011). BHT对6种植物病原真菌抑制作用的研究. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 31 (1): 47–49]
- Guo LY, Li JY, Li BH, et al (2009). Investigations on the occurrence and chemical control of *Botryosphaeria* canker of apple in China. *Plant Protec*, 35 (4): 120–123 (in Chinese with English abstract) [国立耘, 李金云, 李保华等(2009). 中国苹果枝干轮纹病发生和防治情况. *植物保护*, 35 (4): 120–123]
- Ji ZL, Ling Z, Zhang QX, et al (2008). Study on the inhibition of *Bacillus licheniformis* on *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola* and *Glomerella cingulata* and biocontrol efficacy on postharvest apple diseases. *J Fruit Sci*, 25 (2): 209–214 (in Chinese with English abstract) [纪兆林, 凌箐, 张清霞等(2008). 地衣芽孢杆菌对苹果轮纹病菌和炭疽病菌的抑制及其对贮藏期苹果轮纹病的防治作

- 用. 果树学报, 25 (2): 209–214]
- Kuk YI, Shin JS, Burgos NR, et al (2003). Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci*, 43: 2109–2117
- Leng WF, Li BH, Guo LY, et al (2009). Method to promote sporulation of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*. *Acta Phytopathol Sin*, 39 (5): 536–539 (in Chinese with English abstract) [冷伟锋, 李保华, 国立耘等(2009). 苹果轮纹病菌诱导产孢方法. *植物病理学报*, 39 (5): 536–539]
- Li BH, Wang CX, Dong XL (2013). Research progress in apple diseases and problems in the disease management in China. *Plant Protec*, 39 (5): 46–54 [李保华, 王彩霞, 董向丽(2013). 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题. *植物保护*, 39 (5): 46–54]
- Li CL, Yu J, Liu ZH (2009). Effects of anti-oxidants on anti-oxidation reservation of semen trichosanthis oil. *J Chin Cereals Oils Ass*, 24 (7): 98–100 (in Chinese with English abstract) [李赤翎, 俞建, 刘仲华(2009). 抗氧化剂对瓜蒌子油抗氧化性能的影响研究. *中国粮油学报*, 24 (7): 98–100]
- Liu L, Meng CY, Li P, et al (2015). Effect of zinc on the ATP enzyme, MAO activity and T-AOC content of rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Chin J Lab Diagn*, 19 (1): 10–13 (in Chinese with English abstract) [刘磊, 孟春阳, 李鹏等(2015). 锌对脊髓缺血再灌注损伤大鼠ATP酶、MAO活性和T-AOC含量影响的研究. *中国实验诊断学*, 19 (1): 10–13]
- Ma L, Han JC, Liu HP (2008). Fungicidal action of active metabolites of endophytic actinomycetes Lj20 from *Cpsicum* spp. *Plant Protec*, 16 (3): 664–668 (in Chinese with English abstract) [马林, 韩巨才, 刘慧平(2008). 辣椒内生放线菌Lj20活性代谢物抑菌作用的研究. *中国生态农业学报*, 16 (3): 664–668]
- Ren J, Wang ST, Hu TL, et al (2014). Evaluation of apple yield loss caused by apple ring rot. *J Henan Agric Sci*, 43 (7): 90–92 (in Chinese with English abstract) [任洁, 王树桐, 胡同乐等(2014). 苹果轮纹病危害损失评价. *河南农业科学*, 43 (7): 90–92]
- Tang W, Ding Z, Zhou ZQ, et al (2012). Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis*, 96 (4): 486–496
- Wang CX, Chen XL, Li BH (2014). Effects of *Valsa mali* var. *mali* infection on defense enzymes activity and MDA content in apple callus. *Plant Physiol J*, 50 (7): 909–916 (in Chinese with English abstract) [王彩霞, 陈晓林, 李保华(2014). 腐烂病菌侵染对苹果愈伤组织防御酶活性及丙二醛含量的影响. *植物生理学报*, 50 (7): 909–916]
- Wang CX, El-Shetehy M, Shine MB, et al (2014). Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Rep*, 7 (2): 348–355
- Wang CX, Zhang QM, Li GF, et al (2012). Identification of the antagonistic bacteria BJ1 and its antifungal activity against *Valsa ceratosperma*. *Acta Phytophy Sin*, 39 (5): 431–437 (in Chinese with English abstract) [王彩霞, 张清明, 李桂舫等(2012). 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株BJ1的鉴定及其抑菌作用. *植物保护学报*, 39 (5): 431–437]
- Yang LL, Zhuang Y, Wang Y, et al (2012). The ultrastructural changes of apple fruit with different resistance infected by *Botryosphaeria dothidea*. *Acta Horti Sin*, 39 (5): 963–969 (in Chinese with English abstract) [杨丽丽, 庄艳, 王忆等(2012). 不同抗性苹果果实受轮纹病菌侵染后亚显微结构的变化. *园艺学报*, 39 (5): 963–969]
- Yong DJ, Wang CX, Li GF, et al (2014). Control efficiency of endophytic actinomycetes A-1 against apple fruit ring rot and its influence on the activity of defense-related enzymes. *Acta Phytophy Sin*, 41 (3): 335–341 (in Chinese with English abstract) [雍道敬, 王彩霞, 李桂舫等(2014). 内生放线菌A-1对苹果果实轮纹病的防效及防御性酶活性的影响. *植物保护学报*, 41 (3): 335–341]
- Zhang GL, Li BH, Wang CX, et al (2010). Curative effects of six systemic fungicides on tumor development on apple-branches caused by *Botryosphaeria dothidea*. *J Fruit Sci*, 27 (6): 1029–1031 (in Chinese with English abstract) [张高雷, 李保华, 王彩霞等(2010). 6种内吸性杀菌剂对苹果枝干轮纹病的治疗效果. *果树学报*, 27 (6): 1029–1031]
- Zhang QM, Wang CX, Yong DJ, et al (2014). Induction of resistance mediated by an attenuated strain of *Valsa mali* var. *mali* using pathogen-apple callus interaction system. *Sci World J*, 2014: 201382
- Zhang QM, Yong DJ, Zhang Y, et al (2016). *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage. *Postharvest Bio Tec*, 115: 30–37
- Zhang ZL, Xu C, Wu JW, et al (2017). The test of antioxidants butylated hydroxytoluene in plastic sports cup by Gas Chromatography-Mass Spectrometry method. *Chem World*, 58 (5): 300–305 (in Chinese with English abstract) [张智力, 许超, 武吉伟等(2017). 气相色谱-质谱联用法测定塑料运动杯中抗氧化剂2,6-二叔丁基对甲基苯酚. *化学世界*, 58 (5): 300–305]
- Zhu XM, Shi XP, Yong DJ, et al (2015). Induction of resistance against *Glomerella cingulata* in apple by endophytic actinomycetes strain A-1. *Plant Physiol J*, 51 (6): 949–954 (in Chinese with English abstract) [朱学明, 史祥鹏, 雍道敬等(2015). 内生放线菌A-1诱导苹果对炭疽叶枯病的抗性. *植物生理学报*, 51 (6): 949–954]

Control efficiency of BHT against apple fruit ring rot and its influence on the activity of defensive enzymes

YU Chun-Lei, MENG Lu-Lu, LIAN Sen, LI Bao-Hua, LIANG Wen-Xing, WANG Cai-Xia*

College of Plant Health and Medicine, Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong, Shandong Province
Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: In the present study, apple fruit (*Malus domestica*) ‘Fuji’ was used to investigate the control efficiency and control mechanism of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) against apple ring rot caused by *Botryosphaeria dothidea* with the wound inoculation. The results showed that when treated with 0.1 mmol·L⁻¹ BHT for 48 to 72 h, followed by *B. dothidea* inoculation, the control efficiency was the best and up to 74%. However, BHT at that concentration had no significant effect on conidial germination and mycelial growth of *B. dothidea*. The activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) as well as the total antioxidant capacity (T-AOC) were significantly enhanced in apple fruits treated with BHT alone or in combination with *B. dothidea*, which were all significantly higher than the control in the determination time. The peaks of defense enzyme activity and T-AOC in fruit treated with BHT were 1.82 to 4.56 times higher than those of controls. In addition, malondiadehyde (MDA) content increased less in fruit treated with BHT and the maximum increase rate was only 78.94%, while, MDA content increased sharply and the strongest increase rate was up to 316.77% in fruit inoculated with *B. dothidea*. The results suggested that BHT could induce apple fruit resistance against *B. dothidea* infection via increasing the activities of defensive enzymes and T-AOC and reducing the accumulation of MDA.

Key words: BHT; *Botryosphaeria dothidea*; induced resistance; defensive enzymes; malondiadehyde

Received 2018-03-01 Accepted 2018-05-08

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2017CXGC0214), the Chinese Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-28), the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0201122), the Taishan Scholar Construction Foundation of Shandong Province, and Graduate Student Innovation Program of Qingdao Agricultural University (QYC201716).

*Corresponding author (cxwang@qau.edu.cn).