

采后 BTH 处理对不同品种芒果果实防御酶活性的影响

潘永贵, 刘新华, 黎寿英
(海南大学食品学院, 海南 海口 570228)

摘要:以“象牙”和“台农”芒果为试材, 研究 BTH 处理对 2 个不同品种芒果果实中主要防御酶——PAL、PPO 和 POD 活性的影响, 以探讨其增强不同果实抗病性的机理。结果表明: 在整个贮藏过程中, “台农”果实本身 3 种酶的活性均明显高于“象牙”果实; 而经 BTH 处理后, 对 2 个品种的芒果果实, 均刺激了 3 种酶活性的上升, 并且“台农”果实上升幅度明显高于“象牙”果实。BTH 处理增强果实抗病性与刺激 PAL、PPO 和 POD 活性上升均有关系, 并且对台农果实作用明显大于象牙果实。

关键词: 芒果; BTH; 防御酶

Effect of BTH Treatment on Defense Enzymes in Postharvest Mango Fruits from Different Varieties

PAN Yong-gui, LIU Xin-hua, LI Shou-ying
(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Nang klangwan* and *Tainong* mango fruits were used as the experimental subjects to conduct BTH treatments. The effect of BTH treatment on the activities of major defense enzymes such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) in postharvest fruits was evaluated to explore the disease-resistance mechanisms of mango fruits from different varieties. Results indicated that the activities of PAL, PPO and POD in *Tainong* mango fruits were obvious higher than those in *Nang klangwan* mango fruits during storage. However, after treated with BTH, the Mango fruits from both varieties exhibited an obvious increase in the activities of three enzymes. Meanwhile, more increase in the activities of three enzymes was observed in *Tainong* mango fruits. In addition, there was an obvious correlation between BTH-induced enhancement of disease resistance and the activities of PAL, PPO and POD in fruits.

Key words: mango; BTH; defense enzyme

中图分类号: S667.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)20-0469-04

病原微生物侵染是导致果蔬采后损失的主要原因之一。虽然使用化学农药防治可起到显著作用, 但其会带来环境污染、农药残留、抗性和对人体健康产生危害等严重问题。我国果蔬产品出口因农药残留超标受到严重制约, 因此一些化学杀菌剂被禁止使用。近年来, 利用诱导剂诱导果蔬自身产生系统获得抗病性(systemic acquired resistance, SAR)逐渐成为果蔬病害防治的发展方向和研究热点。其中苯丙噻二唑(benzothiadiazole, BTH)为其中一种。

苯丙噻二唑是一种人工合成并且商品化了的植物抗病性化学诱导剂, 它是诱发 SAR 反应的化合物^[1]。目前 BTH 在果蔬采前控制植株病害方面研究较多, 例如番

木瓜^[2]、番茄^[3]、辣椒^[4]、黄瓜^[5]等, 而采后果蔬中研究较少。但从研究报道来看, 同样表明 BTH 对于防治果蔬采后病害具有一定的效果, 例如 200 $\mu\text{m}/\text{mL}$ 质量浓度处理桃果实能提高防御酶活性和次生代谢物质的含量^[6]; Terr 等^[7]报道, 采后草莓上使用 BTH 可有效抑制灰葡萄孢侵染引起的灰霉病, 王金华^[8]报道采用质量浓度 50 $\mu\text{m}/\text{mL}$ BTH 处理香蕉果实能有效防治香蕉采后炭疽病的发生。本研究发现 BTH 处理芒果果实同样可以减轻芒果果实采后炭疽病的产生, 但对于不同的品种其有效浓度不同, 对于“象牙”果实, 200mg/L 处理效果最好, “台农”果实则为 50mg/L 处理效果最好^[9]。许多研究表明, 在植物组织抗病性方面, 包括 PAL、PPO 和 POD

收稿日期: 2010-06-22

基金项目: 海南省自然科学基金项目(310032); 海南大学(原华南热带农业大学)博士启动基金项目(Rndy0704)

作者简介: 潘永贵(1970—), 男, 副教授, 博士, 主要从事热带果蔬采后生理与保鲜技术研究。

E-mail: yongui123@126.com

在内的防御酶起着重要的作用^[10]。本实验主要在上述研究结果基础上,进一步研究BTH处理对不同品种芒果果实防御酶的影响,以探讨其增强果实抗病性的机理以及不同品种芒果果实所需最适BTH浓度的原因。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

海南主栽品种“象牙”(Nang klangwan)和“台农”(Tainong)芒果,采自海南省东方市广坝农场;炭疽病菌(*Colletotichum gloeosporioides*),由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供,在PDA培养基上培养8d,培养温度28℃。

苯并噻唑(BTH)(商品名Bion,英文通用名:Acibenzolar-S-methyl),瑞士先正达公司生产,有效成分为50%。

1.2 BTH处理

用去离子水分别配制成0、50、200mg/L 3种质量浓度BTH溶液(内含体积分数0.05%吐温-80)。挑选成熟度、大小基本一致、无机械损伤和病虫害的2个品种的果实,分别分成2组,“象牙”芒果分别用0、200mg/L,“台农”分别用0和50mg/L BTH溶液浸泡10min,取出后自然晾干。然后装入厚度为0.03mm的低密度聚乙烯薄膜塑料袋,每袋5个。最后置于15℃下贮藏。每处理果实60个。

1.3 接种处理

参照王金华^[8]的方法并作修改:将前处理好的芒果在15℃贮藏72h后,进行接种处理。将培养好的炭疽病菌用损伤接种法接种。在每只芒果的果皮上等距离刺伤3个伤痕(用直径为1mm的3枚针(组合在一起)刺入1mm深),并用棉花擦去分泌出来的果胶,然后将菌饼(直径为1.5mm)贴在刺伤部位,再用棉花保湿24h,接种完毕后,继续在15℃贮藏,相对湿度75%~85%。

1.4 取样

果实接种后,每隔一定时间,取病健交界处果肉组织,每处理每次取样果实总数为10个,取样组织液液氮冷冻后再破碎混合。-20℃保存待用。

1.5 测定指标

1.5.1 多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)的测定

酶液的制备:取果肉1g,放入预冷研钵中,加入5mL 0.1mol/L pH7.0的磷酸缓冲液(含1g/100mL PVPP,1mmol/L 聚乙二醇6000,0.3%(V/V)Triton-100,1mmol/L EDTA),冰浴研磨成匀浆。将匀浆液全部转入离心管中,于4℃ 12000r/min离心20min,上清液即为粗酶液,转入5mL离心管中,用于PPO和POD活性测定。

酶活性的测定:参照李合生^[11]的方法并作修改:

PPO活性:反应体系:0.5mL酶液和0.02mol/L邻苯二酚溶液1.8mL(用缓冲液配制),1mL磷酸缓冲液。以磷酸缓冲液代替酶液作为对照,其余同反应体系,24℃条件从加入酶液开始记录每分钟反应体系在398nm下OD值,以OD值变化0.001为一个酶活性单位,用U/(g m_f·min)表示酶活力。样品重复测3次。

POD活性:反应体系:1mL磷酸缓冲液,0.2mL酶液、0.05mol/L愈创木酚1.8mL(用磷酸缓冲液配制)后于30℃水浴中保温10min、2%过氧化氢0.5mL(用磷酸缓冲液配制)。24℃从加入酶液开始记录每分钟反应体系在470nm OD值,以磷酸缓冲液代替酶液作为对照以OD值变化0.001为一个酶活性单位。样品重复测3次。

1.5.2 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定

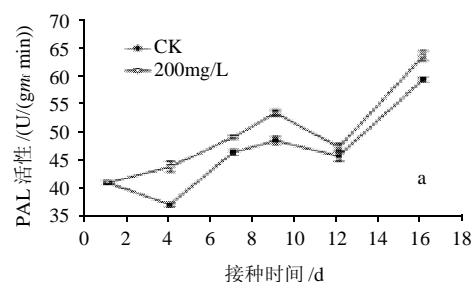
参照崔彦玲等^[12]的方法并做修改:取果肉1g,放入预冷的研钵中,加入5mL 0.1mol/L pH8.8硼酸缓冲液(内含5mmol/L 巯基乙醇、1mmol/L EDTA以及1g/L的PVP),在冰浴中研磨成匀浆,然后于4℃ 12000r/min离心20min,上清液即为粗酶液转入5mL离心管中,用于PAL活性的测定。

在5mL反应体系中,含0.5mL酶液,3.50mL硼酸缓冲液和0.02mol/L L-苯丙氨酸1mL,测定时的对照不加酶液而用0.5mL硼酸缓冲液代替,其余同反应体系,反应体系于40℃水浴中保温60min后,立即加入6mol/L HCl 0.2mL终止反应,随后测定OD₂₉₀值,以OD值变化0.001为一个酶活性单位,用U/(g m_f·min)表示酶活力。样品重复测3次。

2 结果与分析

2.1 采后BTH处理对芒果果实PAL活性的影响

如图1所示,接种炭疽病菌后,对于两个品种芒果,对照和BTH处理的果实中PAL酶活性都呈上升趋势。在整个贮藏过程中,BTH处理的两个品种果实中PAL活性始终高于对照果实,而“台农”果实更明显。表明BTH处理有利于果实中PAL酶活性的上升。通过对两个品种未经BTH处理的果实中PAL活性比较可以看出,“台农”果实本身的PAL酶活性高于“象牙”果实,而经BTH处理后,“台农”果实中PAL活性上升速度也要明显快于“象牙”果实。



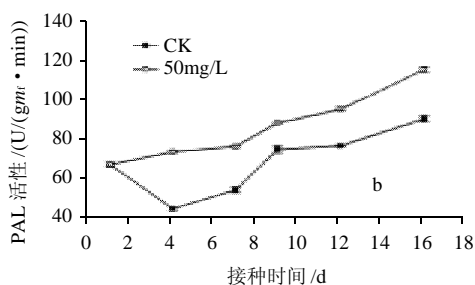


图1 采后BTH处理对损伤接种“象牙”(a)和“台农”(b)芒果果实中苯丙氨酸解氨酶活性的影响

Fig.1 Effect of BTH treatment on PAL activity in *Nang klangwan* and *Tainong* mango fruits

2.2 采后BTH处理对芒果果实PPO活性的影响

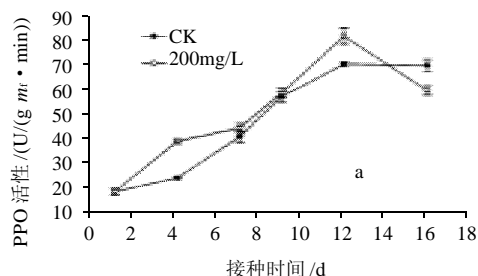


图2 采后BTH处理对损伤接种“象牙”(a)和“台农”(b)芒果果实中多酚氧化酶活性的影响

Fig.2 Effect of BTH treatment on PPO activity in *Nang klangwan* and *Tainong* mango fruits

如图2所示,对于“象牙”和“台农”果实,在整个贮藏过程中,两个品种的对照果实在接种病菌后,果实中PPO活性变化趋势均呈先升后降的变化趋势,但是“象牙”果实中PPO上升速率较“台农”果实缓慢,而且“台农”果实本身的PPO活性要明显高于“象牙”果实,在上升期间,前者约是后者2倍。经BTH处理的两个品种果实中PPO活性变化趋势与对照果实一致,且均高于各自对照果实,而BTH处理的“台农”果实表现更加明显(图2b),表明BTH处理增强了果实中PPO酶活性。

2.3 采后BTH处理对芒果果实POD活性的影响

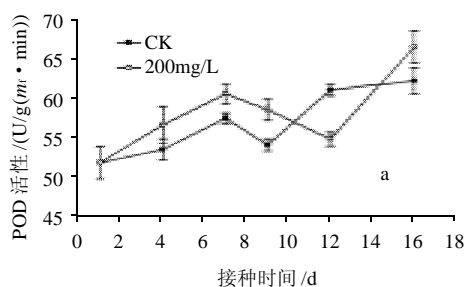


图3 采后BTH处理对损伤接种“象牙”(a)和“台农”(b)芒果果实中过氧化物酶活性的影响

Fig.3 Effect of BTH treatment on POD activity in *Nang klangwan* and *Tainong* mango fruits

如图3所示,接种病菌后,在整个贮藏期间,两个品种的对照果实中POD酶活性均呈曲线上升趋势,而且,“台农”果实本身的POD酶活性明显高于“象牙”果实。经BTH处理的两个品种果实中POD酶活性变化趋势与对照基本一致,但高于各自对照果实,与前面PPO酶活性变化一样,BTH处理的“台农”果实中POD酶活性明显高于对照果实,在两个峰值时分别高出对照40.7%和23.5%。BTH处理可以明显增加两种果实中POD酶的活性,有利于增强BTH处理的果实抵抗病原菌的入侵。

3 讨论

苯丙烷代谢途径是植物细胞中许多防御性次生代谢产物的共同途径,目前,PAL是该途径研究最为深入的酶。PAL是植物苯丙烷类代谢途径的起始酶,也是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,可催化L-苯丙氨酸直接脱氨产生反式肉桂酸,最终转化为木质素及其次生产物(酚类、香豆酸、黄酮等),这些产物与植物的防卫反应及抗病性密切相关,因此,PAL被认为是植物的防御酶之一^[13];POD和PPO则同属于氧化酶体系,主要参与酚的氧化,形成对病菌毒性较高的醌类物质,并参与木质素的合成,使细胞壁增厚来抵御病菌的侵入和扩展从而抑制发病,其活性与抗病性有密切关系^[14-16]。本研究结果表明,经BTH处理的“象牙”和“台农”果实,在接种病原菌后,果实中PPO、POD和PAL活

性明显升高,参与了BTH诱导的果实对病原菌侵染的抗性反应。这与经BTH处理的黄瓜^[14]、甜瓜^[17]、桃^[18]、鸭梨^[19]和香蕉^[20]等果实的结果一致。增强的POD、PPO和PAL活性是与BTH诱导的芒果果实的抗性反应密切相关。同时也发现,与对照相比,BTH处理的“台农”果实中PPO、POD和PAL活性迅速增强,而BTH处理的“象牙”果实增强缓慢。同时,“台农”果实本身PPO、POD和PAL活性也要明显高于“象牙”果实。这些结果在一定程度上解释了“台农”果实能够在较低的BTH处理浓度下就能达到较好的抗病效果。

参考文献:

- [1] FRIEDRICH L, LAWTON K, RUESS W, et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco[J]. *Plant J*, 1996, 10: 61-70.
- [2] TERRY L A, JOYCE D C. Suppression of grey mould on strawberry with the chemical plant activator acibenzolar[J]. *Pest Management Sci*, 2000, 56(11): 989-992.
- [3] 王金华. BTH防治香蕉采后炭疽病及其系统获得抗性(SAR)机理[D]. 广州: 华南农业大学, 2005.
- [4] 刘新华, 潘永贵, 祖鹤, 等. 不同品种芒果采后抗炭疽病最适BTH浓度研究[J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(7): 7-11.
- [5] 刘新华, 潘永贵, 祖鹤. BTH诱导果蔬抗病性机理研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(34): 15053-15054; 15062.
- [6] 李合生. 植物生理生化试验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 167-169.
- [7] 崔彦玲, 张环. 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相互关系[J]. *华北农学报*, 2003, 18(1): 12-15.
- [8] 潘永贵, 谢江辉. 现代果蔬采后生理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 146-171.
- [9] 王莉. BTH诱导黄瓜和番茄对主要病害的抗性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [10] 李落叶, 郭萍, 井金学, 等. 低聚糖诱导小麦抗条锈性及相关酶活性变化的研究[J]. *西北植物学报*, 2003, 23(10): 1784-1787.
- [11] 郭红莲, 程根武, 陈捷, 等. 玉米灰斑病抗性反应中酚类物质代谢的研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 342-346.
- [12] 王春林. BTH诱导甜瓜(*Cucumis melo* L.)抗白粉病机理及信号转导途径的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [13] 刘红霞. 1-MCP、BTH和PHC对桃果(*Prunus persica* L.)采后衰老的调控作用及诱导抗病机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [14] 曹健康. SA、ASM、INA和柠檬酸对鸭梨果实采后抗病性和品质的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [15] 麻宝成, 朱世江. 苯并噻重氮和茉莉酸甲酯对采后香蕉果实抗病性及相关酶活性的影响[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(6): 122-1227.