

重组几丁质酶对采后葡萄贮藏过程中抗病效果的研究

阎瑞香¹ 李 宁²

(1. 国家农产品保鲜工程技术研究中心,天津市农产品采后生理与贮藏保鲜重点实验室,天津 300384; 2. 天津农学院 园艺系,天津 300384)

摘要:以克瑞森无核葡萄品种为试材,采用重组几丁质酶对接种灰霉菌的葡萄果实进行处理,研究重组几丁质酶对葡萄果实腐烂的抑制及其诱导抗病作用。结果表明:在 25℃ 条件下,重组几丁质酶处理能诱导采后葡萄的抗病性,不仅增加了葡萄果实中 POD、PPO 和 PAL 的酶活性,而且降低了丙二醛含量,诱导了果实中酚类物质含量的积累;在不同程度上延缓了葡萄的发病时间,降低了发病指数。贮藏至第 6 天时,对照的发病指数已达到 100%,而重组几丁质酶处理的发病指数仅为 47.8%。总的来看,重组几丁质酶处理可以提高葡萄采后抗病性,在贮藏初期抑制由灰霉引起的葡萄腐烂。

关键词:重组几丁质酶;采后腐烂;葡萄;诱导抗病

中图分类号:S663.01 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)06-0158-05

Effect of the Recombinant Chitinase on the Disease Resistance in Table Grape during Postharvest Storage

YAN Rui-xiang¹, LI Ning²

(1. National Engineering and Technology Research Center of Agriculture Products Freshness Protection, Tianjin Key Laboratory of Postharvest Physiology and Storage of Agricultural Products, Tianjin 300384, China;
2. Department of Horticulture, Tianjin Agriculture College, Tianjin 300384, China)

Abstract: The objective of this study was to determine the mechanism and disease-resistant effect of recombinant chitinase on the table grape during storage. The purified recombinant chitinase was added to the wound of Crimson seedless table grape which had already been inoculated with *Botrytis cinerea*. The activity of disease-resistant enzyme of the treated grape was analyzed during storage at 25℃. The results showed that the recombinant chitinase treatment could induce the increase of POD, PPO and PAL enzyme activity and reduce the content of MDA and induce fruit phenolics content accumulation. Recombinant chitinase could retard onset time of grey disease symptom and lower disease index during grape storage. Morbidity index of control grape reached 100% on day 6, but recombinant chitinase treated grape only had the morbidity index of 47.8%. Overall, the recombinant chitinase could induce disease-resistance of grape to *Botrytis cinerea* and inhibit postharvest decay at early storage.

Key words: Recombinant chitinase; Postharvest rot; Grape; Induce of disease resistance

果蔬采后病害导致的巨大损耗已成为全球共同关注的问题,微生物侵染是造成腐烂的主要原因,由此造成的损失非常巨大。针对这一问题,科研工作者对果蔬采后贮藏过程进行了大量研究,低温、品种^[1]及气调等常规贮藏方法已研究得非常深入,但仍不能有效地控制采后病害^[2]。目前,控制采后病害的主要手段是使用化学杀菌剂,许多果蔬专用化学药剂已商业化生产,在很长一段时间内以其高效、

低成本、使用方便等特点得到推广使用,但他们在果蔬中的残留毒性对人类健康的潜在危险已成为全社会关心的问题。生物防治具有不污染环境、无农药残毒、不产生抗药性和处理费用低廉等优点,受到人们的广泛关注。借鉴采前病害生物防治的思路,人们提出了果蔬采后病害生物防治的设想。Wilson等^[3]提出了果蔬采后病害生物防治的主要途径:①利用拮抗菌(包括拮抗真菌和细菌)的拮抗作用来

收稿日期:2012-07-05

基金项目:国家青年科学基金项目(31101362)

作者简介:阎瑞香(1973-),女,河南郑州人,副研究员,博士,主要从事农产品采后生理及保鲜新技术研究。

控制病原菌;②利用植物中有抗菌活性的次生代谢物质;③诱导果蔬提高自身抗病力来抵抗病原菌的侵染;④利用基因工程方法导入抗病基因,培育抗病品种。利用外源抗病基因,如几丁质酶基因、 β -1,3-葡萄糖酶基因、核糖体灭活蛋白基因(RIP)等转入酵母细胞,再分离、纯化出此活性蛋白,利用1种或几种活性蛋白协同作用,增强抗菌防腐效果,用于果蔬采后保鲜,安全、营养、高效,目前在国际上是一个全新领域。采用原核表达系统生产的几丁质酶基因的抗真菌作用已在水稻、油菜、烟草等多种作物中表达而得到证实,但目前有关几丁质酶对果品蔬菜上常见病原菌的抑制作用的研究尚未见报道。

本试验利用DNA重组技术构建几丁质酶,研究其对葡萄采后抑制腐烂和诱导抗病的作用,为采后生物防治及重组几丁质酶复合保鲜剂在果蔬生物保鲜上的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以克瑞森无核葡萄品种为试材(Crimson seedless),采收后在0℃冷库中存放7 d,进行以下不同处理。

1.2 孢子悬浮液的制备

Botrytis cinerea 孢子悬浮液的制备:用无菌水冲洗长满孢子的*Botrytis cinerea*平板,用血球计数板计数,孢子浓度为 1.2×10^6 个/mL,备用。

1.3 几丁质酶的制备

重组几丁质酶的制备参照文献[4]进行。取已分离、纯化并冷冻干燥后的几丁质酶粉末1 g溶于100 mL的2 mmol/L EDTA溶液中,配制成几丁质酶液备用。

1.4 试验处理

用75%乙醇进行表面消毒,无菌水冲洗,自然干燥。用无菌牙签于果柄一测刺破果实,人为造成伤口,伤口直径2.5~3.0 mm,深3~4 mm,每伤口加入30 μ L的处理液(a.灭活的重组几丁质酶液;b.重组几丁质酶)静置1 h后,每伤口处加入10 μ L病原菌孢子悬浮液,静置1 h左右。以上操作在超净工作台上进行,将处理过的葡萄放入消毒后的干燥器中,25℃下保湿培养。每处理80个果实,重复3次,每天取样一次(取样时,避开伤口部位),连续取样8次,测定以下指标。

1.5 指标测定

1.5.1 丙二醛(MDA)含量的测定 定期取果10个,切取果实0.5 g,加入0.05 mol/L pH值7.8的

磷酸缓冲液和少量石英沙,再加入5% TCA 5 mL研磨,匀浆在3 000 r/min下离心10 min。取上清液2 mL,加入0.67% TBA 2 mL,混合后在100℃水浴上煮沸30 min,冷却后再离心1次,分别测定上清液在450,532,600 nm处的吸光值,并按公式 $C(\mu\text{mol/L}) = 6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$,计算出MDA浓度,再计算出单位组织中MDA的含量($\mu\text{mol/L}$)。

1.5.2 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定 定期取果10个,切取果实0.5 g,加入0.4 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP),以2:7.5加入含5 mmol/L巯基乙醇的硼酸缓冲液(0.05 mmol/L, pH值8.8),冰浴研磨,15 000 r/min离心20 min,上清液用于酶活测定。取上清液0.2 mL,5 mmol/L巯基乙醇的0.1 mol/L硼酸缓冲液(pH值8.8)1.8 mL,0.02 mol/L L-苯丙氨酸1 mL,混匀后立即用分光光度计测 OD_{290} 初始值,38℃水浴30 min,以0.25 mL 5 mol/L HCl终止反应,测 OD_{290} 终止值,以每30 min $\Delta OD_{290} = 0.01$ 为一个酶活单位,用U表示。

1.5.3 多酚氧化酶(PPO)活性测定 定期取果10个,切取果实0.5 g,加入0.4 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP),适量磷酸缓冲液,匀浆转入离心管中,于5 000 r/min离心10 min,上清液转入25 mL容量瓶中,沉淀用5 mL磷酸缓冲液再提取2次,上清液并入容量瓶中,定容至刻度,低温下保存备用。反应体系:2.9 mL 0.045 mol/L(pH值5.5)磷酸缓冲液;1.0 mL 2% H_2O_2 ;1.0 mL 0.05 mol/L愈创木酚和0.1 mL酶液。以加热煮沸5 min的酶液为对照,反应体系加入酶液后,立即于37℃水浴中保温15 min,然后迅速稀释1倍,470 nm下比色,每隔1 min记录一次吸光值,共记录5次,然后以每分钟内 A_{470} 变化0.01为一个酶活性单位,用U表示。

1.5.4 过氧化物酶(POD)活性测定 样品提取与PPO同。反应体系:3.9 mL磷酸缓冲液,1 mL儿茶酚和0.1 mL酶液,以煮过失活的酶液为对照,加入酶液后,立即于37℃水浴中保温10 min,迅速放入冰浴中,立即加入2 mL 20%三氯乙酸,10 000 r/min离心10 min,取上清液稀释1倍,于525 nm波长下比色。酶比活力($0.01\Delta A / (g \cdot \text{min})$) = $\Delta A / 0.01 \text{wt} \times D$,单位用U表示。

1.5.5 几丁质酶活性的测定 几丁质酶活性采用DMAB法,参照文献[5],585 nm下测OD值,一个酶活性单位(U)定义为每小时每毫升酶液作用后释放出1 μ g的N-乙酰氨基葡萄糖。

1.5.6 酚类物质含量的测定 取10个果实,在果实相同部位取1.0 g,冰浴研磨于50 mL三角瓶中,

加入 25 mL 75% 的甲醇密封, 55℃ 水浴浸提 3 h, 冷却, 加压过滤, 并用 75% 甲醇溶液定容至 50 mL。采用 Folin-Ciocalteu 试剂法测定总酚含量, 结果以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 表示。

1.5.7 果实腐烂指数 果实腐烂指数调查: 按照果实腐烂面积大小将果实划分为 5 级: 0 级, 无腐烂; 1 级, 果实腐烂面积占果实总面积 $< 1/4$; 2 级, 果实腐烂面积占总面积 $\geq 1/4, < 1/2$; 3 级, 果实腐烂面积占总面积 $\geq 1/2, < 3/4$; 4 级, 果实腐烂面积占总面积 $\geq 3/4, \leq 1$ 。

按下式计算腐烂指数: 腐烂指数 = $\sum [(\text{腐烂级别} \times \text{该级果实数}) / (\text{最高腐烂级别} \times \text{总果实数})] \times 100\%$ 。腐烂指数越大, 表示果实腐烂越严重。

1.6 数据处理

数据采用 SPSS 进行处理, 用邓肯氏法进行平均数多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同处理对葡萄采后丙二醛 (MDA) 含量的影响

利用重组几丁质酶对葡萄进行处理, 在处理不同时间测定其 MDA 的变化, 结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, 在整个贮藏过程中, MDA 均呈上升趋势, 尤其在处理后 2 d 内迅速上升, 之后上升趋势较为缓慢。从第 2 天开始, 重组几丁质酶处理的 MDA 含量显著低于对照处理 ($P < 0.05$), 到第 8 天时, 重组几丁质酶处理的 MDA 含量低于对照处理 42.94%, 说明重组几丁质酶可以降低葡萄的细胞膜过氧化进程, 延缓果实衰老, 提高果实的抗病性。

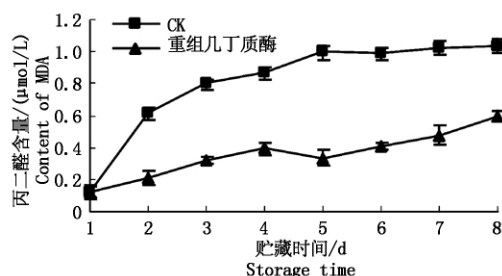


图 1 不同处理下葡萄采后丙二醛 (MDA) 含量的变化
Fig. 1 Changes of the content of MDA with different treatments in postharvest grape

2.2 不同处理对葡萄采后苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的影响

用重组几丁质酶对葡萄进行处理, 在处理不同时间测定其苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的活性变化, 结果如图 2 所示。PAL 活性在整个贮藏过程中呈下降趋势, 在前 5 d 时下降幅度较大, 之后趋于平缓。第 1 天时, 重组几丁质酶处理的 PAL 活性为 2.43 U, 显著高于对照处理 1.72 U ($P < 0.05$), 前 5 d, 重

组几丁质处理 PAL 活性均高于对照处理。由此可以看出, 重组几丁质酶处理可以诱导采后葡萄果实中 PAL 活性的升高, 并且延缓贮藏过程中 PAL 活性的下降, 但是 5 d 后处理和对照之间的差异不显著 ($P > 0.05$), 这说明重组几丁质酶在贮藏前期诱导了葡萄果实内 PAL 活性升高, 后期诱导效果不理想。

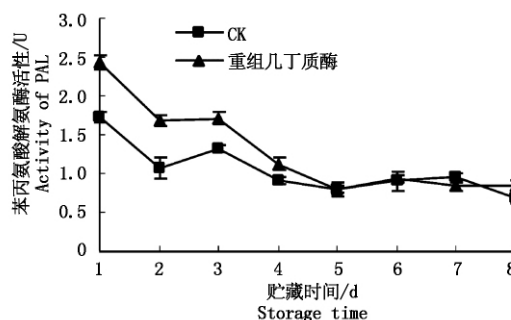


图 2 不同处理下葡萄采后苯丙氨酸解氨酶活性的变化
Fig. 2 Changes of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity with different treatments in postharvest grape

2.3 不同处理对葡萄采后多酚氧化酶 (PPO) 活性的影响

葡萄果实经处理后, 各处理 PPO 变化趋势与对照基本一致, 早期呈下降趋势, 随后开始呈缓慢上升趋势, 达到活性高峰后又逐渐下降 (图 3)。贮藏至第 8 天时, 几丁质酶处理的 PPO 活性 0.11 U 显著高于对照处理 0.06 U ($P < 0.05$), 说明几丁质酶处理显著诱导了采后葡萄果肉中 PPO 活性的升高。PPO 活性升高可以催化木质素和其他酚类氧化产物的形成, 构成保护性屏障而抵抗病菌入侵, 也可通过形成醌类物质直接发挥抗病作用, 由此可以看出, 重组几丁质酶可以通过诱导葡萄果实内 PPO 活性的升高诱导抗病。

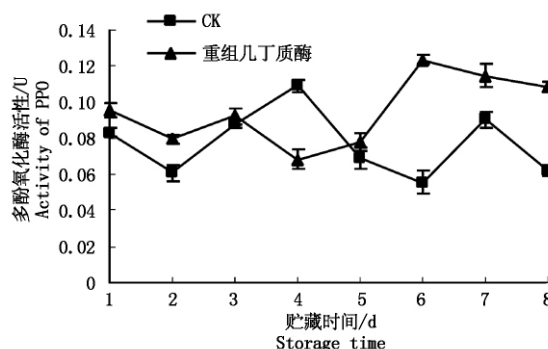


图 3 不同处理下葡萄采后多酚氧化酶 (PPO) 活性的变化
Fig. 3 Changes of polyphenoloxidase (PPO) activity with different treatments in postharvest grape

2.4 不同处理对葡萄采后过氧化物酶 (POD) 活性的影响

在试验过程中, 葡萄果肉的 POD 活性大致呈上升趋势 (图 4), 且几丁质酶处理过的 POD 活性均高于对

照处理 到第 6 天时达到最大值 活性为 0.015 7 U ,显著高于对照 0.011 4 U ,表明重组几丁质酶处理的酶活性可以维持较高的水平。POD 是植物体内重要的活性氧酶促清除系统 ,POD 活性从第 3 天开始 ,活性均显著高于对照 ,表明葡萄果实自身抵御外界不良环境 ,降低活性氧自由基对质膜的伤害和细胞膜相对透性 ,从而维持了细胞质膜的稳定性和完整性。

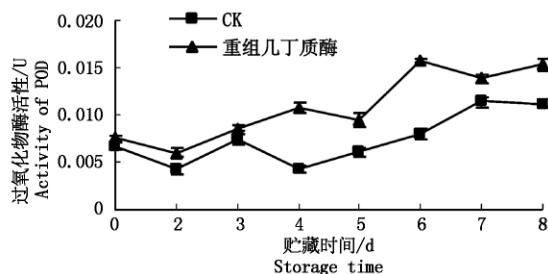


图 4 不同处理下葡萄采后过氧化物酶(POD)活性的变化

Fig. 4 Changes of peroxidase(POD) activity with different treatments in postharvest grape

2.5 不同处理对葡萄几丁质酶活性的影响

试验结果表明 ,在贮藏初期 ,几丁质酶活性均比较低 3 d 后 ,酶活性突然升高 ,波动幅度较大 ,在第 8 天时 ,对照的几丁质酶活性升高至 4.37 U ,而重组几丁质酶处理活性为 8.19 U ,比对照高近 1 倍(图 5)。表明重组几丁质酶处理能够诱导内源几丁质酶的产生和积累 ,果实体内几丁质酶活性的升高可以直接对病原菌起作用 ,从而提高葡萄果实的抗病性。

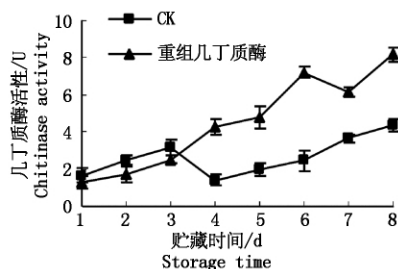


图 5 不同处理下葡萄采后几丁质酶活性的变化

Fig. 5 Changes of the chitinase activity with different treatments in postharvest grape

2.6 不同处理对葡萄酚类物质的影响

试验结果表明 ,酚类物质在贮藏过程中呈现双峰曲线(图 6)。在 5 d 前出现一个高峰 ,处理的峰值都远高于对照 ,并且几丁质酶处理的峰出现于第 3 天 ,达到 207 $\mu\text{g/g}$,而对照的峰值稍晚 1 d 出现 (118.98 $\mu\text{g/g}$) ;另一个高峰分别出现在第 7 天和第 6 天 ,此时几丁质酶处理的峰值低于第 1 个峰值活性(139.81 $\mu\text{g/g}$) ,这说明重组几丁质酶处理可以加快植物体内总酚含量积累的速度 ,有助于植物抗病性的提高。酚类物质与植物的抗病性有密切关系 ,但是酚类物质的积累要依赖于植物体内多种生理过程

来调节。重组几丁质酶处理能通过调节植物体内的抗病相关酶活性来调节葡萄果实内的酚类物质含量 ,从而起到抗病的作用。

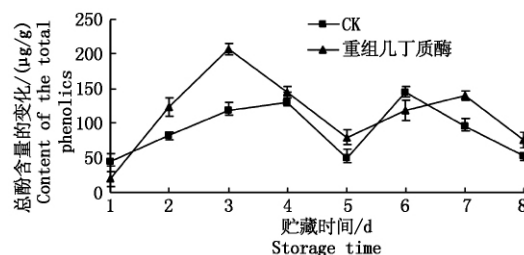


图 6 不同处理下葡萄采后总酚含量的变化

Fig. 6 Changes of the content of phenols with different treatments in postharvest grape

2.7 重组几丁质酶处理对果实采后病害防治的影响

对重组几丁质酶处理葡萄采后 3, 6, 9 d 的发病情况进行调查 ,结果表明 ,重组几丁质酶处理在不同程度上延缓了葡萄采后的发病时间 ,降低了葡萄的病情指数(图 7)。在贮藏初期 ,重组几丁质酶能够有效地控制葡萄发病速度。在葡萄贮藏至第 6 天时 ,对照的病情指数已达到 100% ,重组几丁质酶处理的仅为 47.8% ,显著低于对照 ($P < 0.05$)。重组几丁质酶对葡萄采后病害防治有较好效果 ,可能来源于诱导植物抗病的作用 ,也有可能源于重组几丁质酶对病原菌的直接作用。

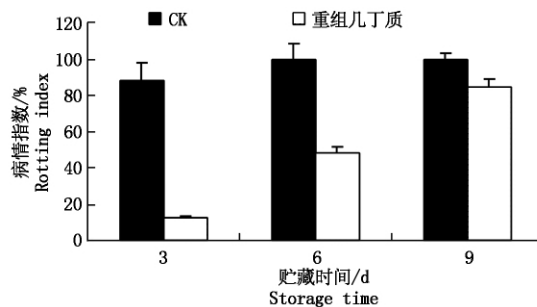


图 7 重组几丁质酶处理对灰霉菌在葡萄发病指数的影响

Fig. 7 Inhibition effects of chitinase treatment on grape infected rate by grey mold

3 结论与讨论

植物中存在的抗病机制多种多样 ,如结构抗性、生化抗性、过敏反应、系统获得抗性、抗侵染、抗扩展等。这些抗性机制从抗病的作用方式看可分为 3 种:形成障碍物以阻止病原菌的侵染和扩展;形成具抑菌活性物质以杀死病原菌;形成酶或化学物质解除病原的致病因子^[6]。从本研究可以看出 ,重组几丁质酶处理可以降低葡萄果实体内 MDA 含量 ,降低葡萄的细胞膜过氧化进程 ,延缓果实衰老 ,通过提高葡萄果实体内的 PAL 提高抗病活性物质 ,POD 活性升高 ,可以提高果实自身抵御外界不良环境 ,降低

活性氧自由基对质膜的伤害和细胞膜相对透性,从而维持细胞质膜的稳定性和完整性;PPO 活性升高可以催化木质素和其他酚类氧化产物的形成,构成保护性屏障而抵抗病菌入侵,也可通过形成醌类物质直接发挥抗病作用,这些物质含量的变化都是通过形成保护性屏障来阻止病原菌的侵染和扩展。重组几丁质酶处理提高了果实体内的几丁质酶活性,说明其可以形成酶类物质来杀死或解除病菌的致病因子,这说明重组几丁质是通过多种作用方式共同作用防治采后葡萄果实腐烂发生的。Ippolito 等^[7]考察了苹果果实采后贮藏中几丁质酶、 β -1,3 葡聚糖酶及过氧化物酶活性受拮抗菌 *Aureobasidium pullulans* 的诱导,却没有进一步研究 PPO 和 PAL 的活性变化情况。本研究表明,几丁质酶处理不仅可诱导葡萄果肉中 POD、PPO 和 PAL 酶活性的增加,还可诱导果皮中酚类物质含量的增加,显著降低葡萄果实的发病指数。

病原菌很容易从果实的伤口处侵入,进而侵染整个果实,许多采后生物防治试验都以刺伤的果实为试材^[8-9]。本研究将纯化的重组几丁质酶应用于接种有灰霉孢子悬浮液的葡萄来调查病情指数,并通过果实内部各种酶活性的变化,探讨几丁质酶的诱导抗病机理。结果表明,重组几丁质酶处理诱导了采后葡萄的抗性,不仅使葡萄果肉中 POD、PPO 和 PAL 的酶活性增加,而且在不同程度上延缓了葡萄的发病时间,降低了发病指数。但随着时间的延长,这种抑制作用逐渐降低。这说明几丁质酶只能在一定时期内抑制果实组织中灰霉菌孢子的萌发和新生菌丝的生长,但不能杀死孢子及已经萌发的菌丝。这可能是与几丁质酶的活性保存时间及果实组织内的反应环境有关,具体的作用机制还有待于进一步研究和探索。

本研究发现,葡萄在用重组几丁质酶处理后,内源的几丁质酶表达量有所提高,可能是由于几丁质

酶与病原菌作用产生的细胞壁破片诱导了植物细胞做出的抗御反应。基于几丁质酶在抗菌应用方面的良好前景,目前有关几丁质酶的研究已引起了很多商业方面的关注。采用复合的几丁质酶生物制剂,进行果蔬采后贮藏保鲜,探索无毒保鲜工艺,将是继抗除草剂、抗病毒、抗虫害等应用后的下一个研发重点。

参考文献:

- [1] 赵旗峰,马小河,董志刚,等.秋红宝葡萄贮藏性和生根性调查分析[J].天津农业科学,2010,16(6):61-63.
- [2] Michael E W, Wilson L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advance [J]. Hort-science, 1992, 27(2): 94-98.
- [3] Wilson C L, Wisniewski M E. Biological control of post-harvest disease of fruits and vegetables: An emerging technology [J]. Ann Rev Phytopathol, 1989, 27: 425-441.
- [4] 阎瑞香,吴仲,侯建华,等.重组水稻几丁质酶的发酵生产、纯化及酶学性质[J].农业生物技术学报,2008,16(1):148-153.
- [5] 方仲达.植病研究方法[M].北京:农业出版社,1997.
- [6] 古瑜,贾占温,孙德岭,等.植物抗病机制的研究进展[J].天津农业科学,2008,14(4):45-48.
- [7] Ippolito A, Ghaouth A E, Wilson L *et al.* Control of post-harvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses [J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 19: 265-272.
- [8] Schena L, Nigro F, Pentimone I *et al.* Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium publicans* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 30: 209-220.
- [9] Zhang H Y, Zheng X D, Fu C X *et al.* Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35: 79-86.