

采后 ASM 诱导处理对鸭梨果实黑霉病的控制

曹建康 姜微波*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: Acibenzolar-S-methyl (ASM) 是重要的植物抗病基因诱导剂。鸭梨果实经过负压渗透 ASM 诱导处理后接种黑霉病 (*Alternaria alternata*)。结果表明, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM 能有效抑制鸭梨果实损伤接种病害和自然侵染病害的发生。ASM 处理果实具有较高的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和几丁质酶 (CHT) 活性, 积累了较高水平的 H_2O_2 和酚类物质。离体试验表明, ASM 不对病原菌生长产生抑制作用。ASM 处理对果实病害的抑制作用可能与其增强了果实抗性系统有关。

关键词: Acibenzolar-S-methyl; 梨; 鸭梨; 链格孢菌; 抗病性

中图分类号: S 661.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 05-0783-05

Control of Black Mould Disease in 'Yali' Pear Fruit by the Treatment with ASM Induction after Harvest

Cao Jiankang and Jiang Weibo*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Acibenzolar-S-methyl (ASM) is an important inducer of genes related to disease resistance in plant. 'Yali' pear fruit were wounded and inoculated with *Alternaria alternata* after vacuum infiltration of ASM. Results showed that $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM treatment effectively inhibited the development of black mould disease in inoculated fruit or in intact fruit, enhanced activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chitinase (CHT), and led to accumulation of H_2O_2 and total phenolic compounds. In vitro experiments indicated that ASM did not inhibit the growth of the fungus, implicated that the alleviation of fruit disease by ASM treatment is attributed to its ability to enhance defense system in fruit rather than its direct inhibitory effect on the fungus.

Key words: Acibenzolar-S-methyl; Pear; Yali pear; *Alternaria alternata*; Disease resistance

近年来, 随着植物诱导抗病性研究的深入发展, 采后果蔬产品的诱导抗病性研究也得到了发展, 并被认为是很有前景的采后处理方式^[1]。研究表明, 外源激发子能通过水杨酸 (SA) 信号转导途径来诱导植物对病原菌侵染的抵抗力, 从而抑制病害的发生。植物抗病基因诱导剂 Acibenzolar-S-methyl [benzo (1, 2, 3) thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester, ASM] 是 SA 结构和功能的类似物, 能有效地诱导多种植物对细菌、真菌和病毒的侵染产生更强的抗性, 但 ASM 本身不具有直接的抑菌作用^[2~4]。目前关于 ASM 诱导植物抗病性的研究主要集中在生长期植物上, 仅 Liu 等^[5]报道采后 BTH (ASM) 处理可抑制桃果实病害。

鸭梨属我国优良梨品种, 耐贮性颇强, 但在贮藏中后期和货架期间, 极易发生由链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 侵染引起的黑霉病。本试验以鸭梨果实为试材, 研究了采后 ASM 处理对鸭梨黑霉病的控制作用及其可能机制。

收稿日期: 2005 - 03 - 25; 修回日期: 2005 - 05 - 09

基金项目: 国家 '863' 计划资助项目 (2002AA2450281)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jwb@cau.edu.cn; jiangweibo@vip.sina.com)

1 材料与方法

1.1 材料与 ASM 处理

鸭梨果实分别采自北京昌平区 (第 1 次试验) 和密云县 (第 2 次试验)。选择大小均匀一致, 无病虫害和机械伤害的果实进行处理。将果实分别浸在 0、0.25、0.5、1.0 mmol · L⁻¹ ASM (CGA 245704, Novartis Inc Switzerland) 的溶液中, 在 3.45 × 10⁴ Pa 真空条件下处理 2 min 后, 再在常压下继续浸泡 8 min。之后将果实晾干, 在 20 ℃、85% ~ 95% RH 贮藏。以清水同样的处理作为对照。定期取样进行理化分析, 同时调查果实自然发病情况。每处理 60 个果实, 重复 3 次。

1.2 病原菌与接种方法

链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr. Fr.) Keissl.] 分离自典型发病果实。经纯化链格孢菌在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上 26 ℃ 活化培养 10 d, 然后用含 0.01% Tween-80 的无菌水配成 5 × 10⁴ CFU · mL⁻¹ 孢子悬浮液。

离体抑菌试验: 将 PDA 培养基融化后冷却至 45 ℃ 时加入用灭菌水配制的 ASM 溶液, 制备成分别含有 0、0.1、0.5、1.0 和 2.0 mmol · L⁻¹ ASM 的平板 PDA 改良培养基。同时, 将链格孢孢子悬浮液与等量 45 ℃ 融化的 PDA 培养基混合、摇匀, 制成平板培养基。待冷却后, 从带有链格孢的平板上打取菌饼 (直径 8 mm), 转接到含 ASM 的 PDA 平板培养基上, 于 26 ℃ 培养 10 d, 测定菌落直径。以灭菌水处理为对照, 每处理 9 个培养皿, 重复 3 次。

果实经 70% 酒精表面消毒后, 用灭菌铁钉在果实中部区域等距离刺 3 个孔 (深 4 mm, 直径 2 mm), 2 h 后向每孔中注入 15 μL 孢子悬浮液。待自然晾干后于 20 ℃、85% ~ 95% RH 贮藏, 定期观察果实发病情况, 并测量病斑直径。每处理用果 60 个, 重复 3 次。

1.3 理化测定

苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性测定: 取 5 g 果肉样品, 加入 5 mL 经 4 ℃ 预冷的 200 mmol · L⁻¹ pH 8.8 的硼酸缓冲液 (含 4% PVP, 2 mmol · L⁻¹ EDTA 和 5 mmol · L⁻¹ - 巯基乙醇) 研磨匀浆后, 在 4 ℃、12 000 ×g 离心 30 min, 上清液用于 PAL 活性测定。0.5 mL 酶液与 3 mL 50 mmol · L⁻¹、pH 8.8 硼酸缓冲液、0.5 mL 20 mmol · L⁻¹ L-苯丙氨酸混合, 在 37 ℃ 保温 70 min。参考 Assis 等^[6]方法测定反应混合液保温前后在 290 nm 吸光度值的变化。酶活性以每小时每毫克蛋白生成 trans-肉桂酸的量来表示。重复 3 次。

几丁质酶 (CHT) 活性的测定: 按照文献 [7] 方法, 制备胶状几丁质悬浮液 (10 mg · mL⁻¹)。取 5 g 果肉, 加入 5 mL 200 mmol · L⁻¹、pH 5.2 的醋酸缓冲液 (含 1 mmol · L⁻¹ EDTA 和 5 mmol · L⁻¹ - 巯基乙醇) 研磨匀浆后, 在 4 ℃、12 000 ×g 离心 30 min, 上清液用于酶活性测定。参考 Boller 等^[8]方法, 取 0.5 mL 粗酶液与 0.3 mL 10 mg · mL⁻¹ 的胶状几丁质悬浮液混合, 在 37 ℃ 保温 1 h。之后再加入 0.1 mL 3% 的脱盐蜗牛酶, 继续在 37 ℃ 保温 70 min, 以释放生成 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 单体。再向反应液中加入 0.2 mL 0.6 mol · L⁻¹ 的四硼酸钾溶液, 沸水浴加热 3 min 后迅速冷却。最后加入 2 mL 2% 二甲氨基苯甲醛 (DMAB) 溶液 (溶于冰醋酸和 10 mol · L⁻¹ 盐酸中 (97.5:2.5)), 在 37 ℃ 保温 10 min 显色, 测定 585 nm 处吸光度值。以煮沸 5 min 酶液作对照, 计算 GlcNAc 生成量。以每秒钟每毫克蛋白分解胶状几丁质产生的 1 × 10⁻⁹ mol GlcNAc 为一个酶活性单位 (U)。重复 3 次。

蛋白含量按照 Bradford^[9]方法测定, 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

过氧化氢 (H₂O₂) 含量测定: 参考 Prochazkova 等^[10]方法, 取 3 g 果肉, 加入 3 mL - 20 ℃ 预冷的丙酮冰浴研磨匀浆后离心 (12 000 ×g, 4 ℃) 20 min。取 2 mL 上清液, 加入 40 μL 20% 的四氯化钛的盐酸溶液和 50 μL 浓氨水, 混匀后室温反应 5 min, 再离心 10 min。取沉淀部分, 用冷丙酮洗涤 3 次, 最后将沉淀溶于 3 mL 1 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 溶液中, 于 410 nm 测定吸光度值。H₂O₂ 含量以 mmol · g⁻¹ FM 表示。重复 3 次。

总酚含量测定: 参考 Pirie 和 Mullins^[11] 方法, 称取 2.0 g 果肉样品, 加入 10 mL 的 1% HCl-甲醇溶液, 冰浴研磨匀浆, 4 提取 1 h 后离心 (4°C , 10 000 \times g, 20 min), 取上清液于 280 nm 测定吸光度值, 用没食子酸作标准曲线, 计算总酚含量, 表示为 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ FM, 重复 3 次。

所有的数据采用 ANOVA 进行邓肯氏多重差异分析。

2 结果与分析

2.1 ASM 处理对鸭梨果实发病率和病斑面积的影响

试验结果 (图 1) 表明, 不同浓度 ASM 处理都降低了接种后 3 d 时果实的发病率。1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM 处理果实发病率分别比对照 (0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 降低 24.1% 和 25.68%, 而 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM 处理效果较差。到接种后 6 d 时, 只有 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM 处理果实发病率仍然显著地低于对照 ($P < 0.05$)。此时, ASM 处理果实病斑面积都显著地小于对照, 但不同浓度处理之间差别不明显。在接种后 12 d 时, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM 处理果实病斑面积显著地低于其它处理, 且比对照降低 27.31%。

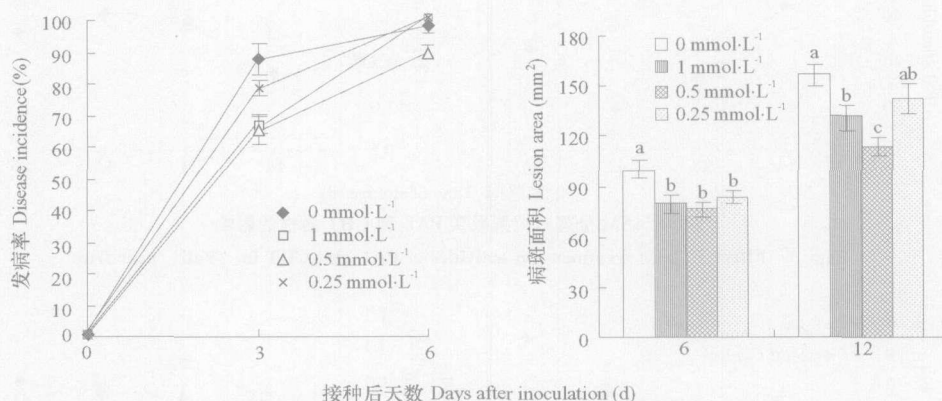


图 1 ASM 处理对鸭梨果实损伤接种黑霉病发病率和病斑面积的影响

图中竖线表示标准误, 相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effect of ASM treatment on disease incidence and lesion area in 'Yali' pear fruit inoculated with *A. alternata*

Bars represent S. E. and values followed by the same letter are not significantly different by Duncan's test at $P < 0.05$.

2.2 ASM 处理对果实自然发病率的影响

鸭梨果实经 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASM 处理后于 20 贮藏, 自然发病率变化如图 2 所示。在贮藏 28、42 和 56 d 时, ASM 处理果实自然发病率分别比对照降低 30.72%、39.57% 和 39.33%。果实在贮藏期间出现的病害主要有黑霉病 (*A. alternata*)、青霉病 (*Penicillium expansum*) 和轮纹烂果病 (*Macrophoma* spp.) 等。在贮藏中后期主要是黑霉病。

2.3 ASM 处理对离体培养链格孢菌生长的影响

不同浓度 ASM 处理对离体培养链格孢菌菌丝生长的影响如表 1 所示。在浓度低于 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ASM 对链格孢菌的生长的直接抑制作用不显著。

2.4 ASM 处理对果实 PAL 和 CHT 酶活性的影响

PAL 和 CHT 是植物体内与抗病性密切相关的两种酶。在贮藏期间, ASM 处理果实 PAL 和 CHT 活性明显高于对照。在贮藏 14、28、42 和 56 d 时, ASM 处理果实 PAL 活性分别比对照升高 25.79%、

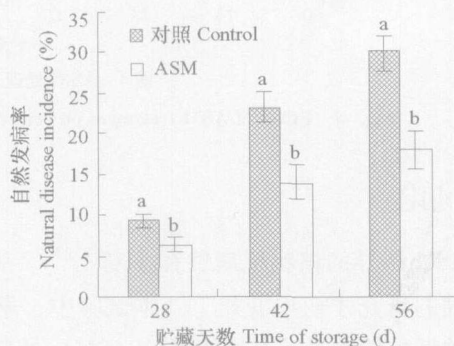


图 2 ASM 处理对贮藏期间鸭梨果实自然发病率的影响

Fig. 2 Effect of ASM treatment on natural disease incidence in 'Yali' pear fruit during storage

92.0%、105.89%和 41.48%；CHT活性分别比对照升高 32.75%、33.39%、23.09%和 18.02% (图 3)。

2.5 ASM 处理对果实 H_2O_2 和总酚含量的影响

在贮藏过程中,随着果实的进一步衰老, H_2O_2 含量逐渐增加 (图 4)。ASM处理果实 H_2O_2 含量在贮藏 14 d时增加较快,高出对照 25.76%,此后增加缓慢。到贮藏 56 d时却显著低于对照。在贮藏过程中,鸭梨果实的总酚含量略有增加后保持稳定 (图 4),ASM在贮藏 14 d和 28 d时分别比对照增加 12.25%和 10.41%,此后下降。

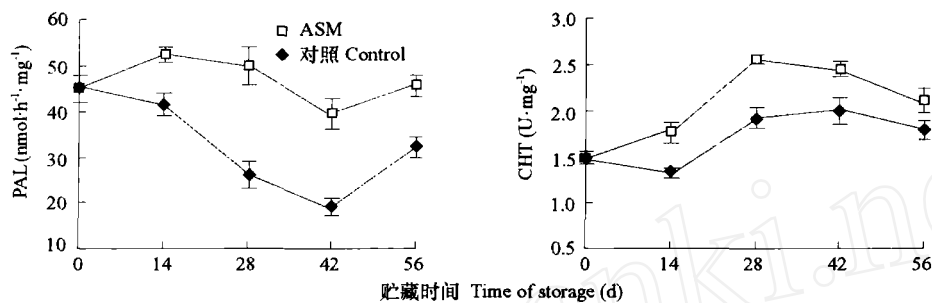


图 3 ASM 处理对鸭梨果实 PAL 和 CHT 活性的影响

Fig. 3 Effect of ASM treatment on activities of PAL and CHT in 'Yali' pear fruit

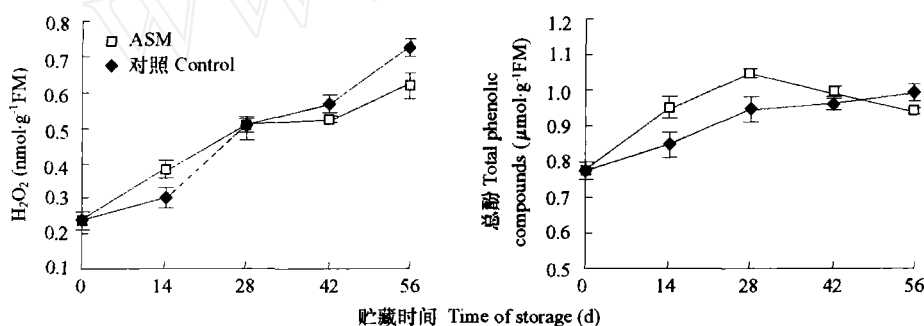


图 4 ASM 处理对鸭梨果实 H_2O_2 和总酚含量的影响

Fig. 4 Effect of ASM treatment on contents of H_2O_2 and total phenolic compounds in 'Yali' pear fruit

3 讨论

ASM诱导的植物抗病性在小麦^[2, 12]、甜瓜^[13]等作物上都有报道。但是,利用ASM诱导果蔬采后抗病性的研究才初步展开^[5]。本试验中,发现采后ASM处理能增强鸭梨果实对损伤接种的链格孢菌侵染的抵抗能力,这与在BTH(ASM)处理抑制桃果实采后病害的试验结果^[5]一致。ASM处理对贮藏期间果实自然病害的控制效果尤为明显,特别是有效地控制贮藏中后期果实病害。研究表明,ASM诱导的作物抗性能持续很长时间,甚至长达一个作物生长期^[2, 13]。本研究中,ASM诱导的果实对自然病害的抗性存在于整个贮藏期。

本研究表明,ASM本身没有直接的抑菌作用,而是通过诱导果实抗性系统的增强来抵御病原菌的侵染,这与人报道^[2, 3]一致。ASM处理使果实抗病性增强可能与PAL活性提高和酚类物质积累有关。PAL是植物苯丙烷代谢途径的关键酶,提高PAL活性能增强植物次生代谢产物如酚类以及其

表 1 不同浓度 ASM 处理对离体培养链格孢菌菌丝生长的影响
Table 1 Effect of treatments with different concentration of ASM on the growth of *A. alternata* in vitro

ASM (mmol · L ⁻¹)	菌落直径 Diameter of colony (mm)
0	54.5 ±2.22a
0.1	52.8 ±2.94a
0.5	50.5 ±3.86a
1.0	50.7 ±1.73a
2.0	50.2 ±2.38a

注: 数值表示为平均值 ±标准误, 相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$)

Note: Values were expressed as means ±S.E. and values followed by the same letter were not significantly different by Duncan's test at $P < 0.05$.

它抗菌物质的生成, 还能增强侵染点周围组织胼胝质沉积和木质化形成以限制病原菌的进一步扩展^[12, 14, 15]。在受侵染组织中, 酚类物质能被氧化成醌类物质直接对病原菌产生毒性^[14]。

CHT参与了植物系统获得抗病性 (Systemic acquired resistance, SAR) 的建立, 被认为是植物体现 SAR的标志酶。ASM能诱导植物 CHT活性升高与植物系统抗病性的增强^[3, 4, 13]。本试验中, ASM处理果实 CHT活性提高, 表明 ASM诱导果实系统抗病性增强。CHT还能通过降解病原菌细胞壁物质, 直接抑制病原菌生长繁殖^[16]。

本研究中, ASM处理后果实 H_2O_2 含量升高, 这与人报道^[4]一致。ASM诱导的植物抗病性与 H_2O_2 含量升高有关。 H_2O_2 参与了侵染点伤口的木质化、膜质过氧化和酚类物质的氧化等过程, 从而增强植物抗病性^[14]。增加的 H_2O_2 也可能作为第二信使参与了 ASM诱导植物信号转导过程^[4]。

多种化学物质如 SA、硅、-氨基丁酸 (BABA)、茉莉酸 (JA) 及其甲酯 (MJ), 生物来源的壳聚糖、蛋白 Hapin 等都能诱导果实抗病性^[1]。ASM 是 SA 结构类似物, 是商品化制剂^[2]。研究 ASM在控制果实采后病害中的作用, 可为减少果实采后腐烂和损失, 减少或代替杀菌剂和农药在果蔬产品中的使用提供有效途径。

参考文献:

- 1 田世平, 产祝龙. 诱导抗性在果蔬采后病害防治中的研究与应用. 植物病理学报, 2004, 34 (5): 385 ~ 394
Tian S P, Chan Z L. Potential of induced resistance in postharvest disease control of fruits and vegetables. Acta Phytopathology Sinica, 2004, 34 (5): 385 ~ 394 (in Chinese)
- 2 Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel K H, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell, 1996, 8: 629 ~ 643
- 3 Lawton K, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T, Ryals J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant Journal, 1996, 10: 71 ~ 82
- 4 Wendehenne D, Dumer J, Chen Z, Klessig D F. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. Phytochemistry, 1998, 47: 651 ~ 657
- 5 Liu H, Jiang W, Bi Y, Luo Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35: 263 ~ 269
- 6 Assis J S, Maldonado R, Munoz T, Escribano M I, Merodio C. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. Postharvest Biology and Technology, 2001, 23: 33 ~ 39
- 7 中国科学院上海植物生理所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 129 ~ 130
Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy Science, Shanghai Society for Plant Physiology. Guide to advanced experiments in plant physiology. Beijing: Chinese Science Press, 1999. 129 ~ 130 (in Chinese)
- 8 Boller T, Gehri A, Mauch F, Vögeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. Planta, 1983, 157: 22 ~ 31
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytic Biochemistry, 1976, 72: 248 ~ 254
- 10 Prochazkova D, Sairam R K, Srivastava G C, Singh D V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. Plant Science, 2001, 161: 765 ~ 771
- 11 Pirie A, Mullins M G. Changes in anthocyanin and phenolic content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. Plant Physiology, 1976, 58: 468 ~ 472
- 12 Stadnik M J, Buchenauer H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2000, 57: 25 ~ 34
- 13 Smith-Becker J, Keen N T, Becker J O. Acibenzolar-S-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and cucumber mosaic virus in cantaloupe. Crop Protection, 2003, 22: 769 ~ 774
- 14 Milosevic N, Shusarenko A J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, 49: 143 ~ 158
- 15 Shadle G L, Wesley S V, Korh K L, Chen F, Lamb C, Dixon R A. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. Phytochemistry, 2003, 64: 153 ~ 161
- 16 Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and -1, 3-glucanase. Plant Physiology, 1988, 88: 936 ~ 942