

鸭梨果实接种轮纹病菌及生长期、贮藏期防御酶系活性变化的研究

祝美云¹, 赵晓芳^{1,2}, 王贵禧^{2*}, 王艳娜², 梁丽松²

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002;

2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育实验室, 北京 100091)

摘要: 该文研究了鸭梨果实受轮纹病原菌(*Botryosphaeria berengriana* f.sp. *piricola*)侵染后, 及其在不同的生长期、贮藏期防御酶活性的变化。结果表明: 鸭梨果实中多酚氧化酶(PPO)活性在接种轮纹病菌 48 h 内显著高于对照, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性在接种 120 h 内一直呈上升趋势, 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性在接种后 72 h 出现活性高峰, 超氧化物歧化酶(SOD)活性在接种后 120 h 内也显著高于对照, 说明这些酶对鸭梨果实抵抗轮纹病密切相关。鸭梨果实在幼果期抗性相关酶主要是 PPO、POD、PAL 和 CAT, 在盛花后 25~75 d 能够保持较高的活性, 而后均显著下降; 在近成熟期与果实抗病性相关酶主要是 SOD 和 PAL, SOD 活性在盛花后 75 d 快速升高至成熟采收达到最大值, PAL 活性在花后 115 d 出现较小的活性高峰。鸭梨果实在贮藏期间与抗病性相关的这 5 种酶活性总体呈下降趋势, 对抵抗病原扩展能力减弱。果实在不同时期对病原菌的抵抗能力与果实中防御酶活性变化密切相关。

关键词: 鸭梨果实; 轮纹病菌; 防御酶; 生长期; 贮藏期

中图分类号: S661.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2008)-3-0251-05

祝美云, 赵晓芳, 王贵禧, 等. 鸭梨果实接种轮纹病菌及生长期、贮藏期防御酶系活性变化的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 251-255.

Zhu Meiyun, Zhao Xiaofang, Wang Guixi, et al. Changes of defense enzyme activity in 'Ya' pear fruit inoculated with *Botryosphaeria berengriana* during growth and storage periods [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(3): 251-255. (in Chinese with English abstract)

0 引言

鸭梨是中国北方地区的主要水果, 虽然鸭梨果实较耐贮藏, 但贮运过程中也容易腐烂, 其中轮纹病是主要贮藏病害之一。由于病原菌在果实生长期潜伏侵染而贮藏期易发病造成腐烂, 不易控制和防范^[1]。植物遭受病原菌侵染后自身会发生植物细胞壁结构的增强、植保素的合成、蛋白酶抑制剂及一些水解蛋白的诱导和积累等一些防御反应^[2-3], 以及控制植物体内与抗病性有关的活性氧代谢的酶系统活性也会发生变化^[4-6]。同时, 植物病原菌能够产生多种植物胞壁降解酶, 这些酶类能够参与病害的扩展^[7]。有研究表明, 轮纹病菌在侵入苹果果实后产生一系列的多聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶甲基酯酶(PMG)是降解果实胞壁的主要酶类, 在整个致病过程中起重要作用^[8]。果实生长发育的不同阶段的抗病能力与

果实的皮孔密度、总酚含量、糖酸含量以及过氧化物酶(POD)活性等密切相关^[9]。为了深入探讨梨果实自身抵抗病原菌的能力, 本研究测定了鸭梨果实在生长发育期、贮藏期以及受轮纹病菌侵染后的 PPO、POD、PAL、SOD、CAT 等防御酶系活性的变化, 为研究梨果实对采收前后对轮纹病产生的抗性机制中酶活性所起的作用提供基本依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试梨: 鸭梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. 'Yali')果实采摘于河北省赵县无公害梨果研究所果园, 盛花期 4 月 12 日, 套袋期 5 月 28 日, 采收期 9 月 26 日。梨果采收后当天运至中国林业科学研究院林业研究所采后试验冷库, 入库温度 10℃, 梯度降温, 30 d 降至 0℃恒温保存。

鸭梨轮纹病原菌: 轮纹病菌(*Botryosphaeria berengriana* f.sp. *piricola*), 来自当地典型轮纹病病果, 参照方中达方法分离纯化^[10], 并经国家林业局林业菌种保藏中心鉴定。

1.2 试验方法

病原菌接种与取样: 选择大小一致、健康的梨果实,

收稿日期: 2007-03-05 修订日期: 2007-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571300/C02021005)

作者简介: 祝美云(1955—), 女, 河南商丘人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为果蔬贮藏与加工研究。郑州 河南农业大学食品科学技术学院, 450002。Email: zmyfood@126.com

*通讯作者: 王贵禧(1962—), 男, 山东安丘人, 研究员, 博士生导师。北京 中国林业科学院林业研究所, 100091。Email: wanggx0114@126.com

经 75%酒精表面消毒。用梨轮纹病菌孢子悬液(浓度为 1×10^5 个/mL) 针刺接种于果实, 用蘸有无菌水棉花团保湿, 27℃ 贮藏间隔 24 h 取样一次。每个果实接种 20 点, 重复接种 6 个果实, 取病斑组织进行酶活性测定。以针刺后涂抹无菌水的果实组织为对照。

生长期取样: 鸭梨果实花后 25~55 d 每隔 10 d 采集 1 次, 花后 75 d 至成熟每隔 20 d 采集 1 次。每次随机取 15 个正常果。贮藏期取样: 贮藏期 5 个月, 每月取样一次。每处理取样 6 个果, 重复 3 次。

1.3 酶活性测定

1.3.1 多酚氧化酶 (PPO) 活性测定

采用 Galeazzi 等^[11]方法测定 OD_{398} 。以不加底物邻苯二酚的反应液为对照, 单位是 $U/(g \cdot \text{min})$ 。

1.3.2 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性测定

采用吴锦程等^[12]方法测定 OD_{290} 。以反应时间零为对照, 单位是 $U/(g \cdot \text{min})$ 。

1.3.3 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定

取果肉 5 g, 加入 20 mL 0.05 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液(含 0.1 mmol/L EDTA; 0.3% (m/V) Triton X-100, 4% (PVPP), 冰浴匀浆, 4℃ 条件下 10000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。在 3 mL 反应液(在 54 mL 14.5 mmol/L DL-甲硫氨酸中分别加入均以 0.05 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液配制的 0.003 mmol/L EDTA, 2.25 mmol/L NBT 和 0.06 mmol/L 核黄素 各 2 mL, 各溶液均在用前配制, 避光放置)的试管中, 加入 0.2 mL SOD 粗酶液, 混合后在透明试管架上, 在 3000 lx 的日光灯下照光 20 min, 温度控制在 25℃, 光照结束后取出试管, 迅速测定 OD_{560} , 以不加酶液的照光管为对照。计算: 以能抑制反应 50% 的酶量为一个 SOD 酶活单位。单位是 $U/(g \cdot \text{min})$ 。

1.3.4 过氧化物酶 (POD) 活性测定

采用李江华^[13]方法测定 OD_{470} 。单位是 $U/(g \cdot \text{min})$ 。

1.3.5 过氧化氢酶 (CAT) 活性测定

粗酶的提取同 SOD。将 0.1 mL 粗酶液和 2 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.8) 在 25℃ 预热 5 min 后, 加入 1 mL 0.2% H_2O_2 。每加一管立即计时, 并迅速倒入石英比色杯中, 240 nm 波长下测定吸光度, 隔 1 min 读数一次, 共测 4 次, 每处理重复 3 次。以 1 min 内 ΔOD_{240} 减少 0.1 个单位为一个酶活单位 (U)。

1.4 统计分析

采用 SPSS (11.0) “paired-sample T Test” 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 受病原菌侵染后 5 种防御酶活性变化

鸭梨果实在接种轮纹病菌后, PPO 活性快速升高, 在

接种后 24 h 和 48 h 的 PPO 活性显著高于对照 ($P < 0.05$), 对照果实的 PPO 活性在 48 h 内没有明显变化, 72 h 之后有所升高, 在 96 h 和 120 h 时则显著高于接种处理 ($P < 0.05$) (图 1a); 接种病原菌后的鸭梨果实中 PAL 活性一直呈上升趋势, 对照则无明显变化, 在接种 120 h 的活性比对照增加了 404.12%, 二者差异极显著 ($P < 0.01$)

(图 1b); 接种病原菌后果肉中 POD 活性快速升高, 至 72 h 时达到最高值 (143.13 $U/(g \cdot \text{min})$), 比对照高出 75.34 $U/(g \cdot \text{min})$, 接种病原菌果实的 POD 活性始终高于对照, 二者差异显著 ($P < 0.05$) (图 1c); 图 1d 为鸭梨果实接种轮纹病菌后 SOD 活性变化。结果显示, 在接菌后的果实中的 SOD 活性显著高于对照 ($P < 0.05$), 并且在 48 h 时出现活性高峰, 72 h 时活性继续增高达到 136.77 $U/(g \cdot \text{min})$, 比对照高出 19.01 $U/(g \cdot \text{min})$; 图 1e 是鸭梨果实在接种轮纹病菌后 CAT 活性变化。在接菌后, 果肉中的 CAT 酶活性迅速上升, 至 72 h 时达到一个活性高峰, 比初始提高 10.12 $U/(g \cdot \text{min})$ 。未接菌果肉在 48 h 后 CAT 活性有所增加, 但显著低于接菌果肉的酶活性 ($P < 0.05$)。

植物感染病原微生物后, 能够形成植物防御素, 木质化作用加强, 以阻止病原菌进一步扩展^[14]。由于 PPO 能够氧化酚类化合物形成对病原菌毒性更强的醌类, 还通过参与酚类物质(如绿原酸, 香豆酸等)的氧化作用而促进木质素的合成^[15]。PAL 活性是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶, 可形成包括植保素、木质素和酚类化合物等抗病次生物质^[16]。植物受到病原菌的入侵可诱导活性氧的迸发, 也是植物对病原菌应答的最早期反应之一。植物在长期的进化过程中形成了一个完善的清除活性氧的防卫系统, 使体内产生与清除活性氧维持在一个动态平衡, POD 与 SOD、CAT 共同组成了生物体内活性氧防御系统, 在清除超氧自由基、 H_2O_2 和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用。POD 在 H_2O_2 参与下催化木质素单体聚合成木质素, 提高组织木质化程度, 从而阻止病原菌的入侵。此外, SOD 和 CAT 在特定条件下产生的 H_2O_2 能够用于细胞壁的木质化, 可抑制病原菌对细胞质膜的破坏^[17, 18]。本试验中, 鸭梨果实在感染轮纹病早期, PPO 活性显著升高, 是果实抵御病原菌侵染的一种生理反应。在病情扩展的后期, PPO 活性可能受组织内部生理代谢紊乱影响而显著低于对照。故 PPO 活性与果实感染轮纹病早期抵抗梨轮纹病关系密切。果实中 PAL 活性在接种病菌后至 120 h 均呈上升趋势, 说明 PAL 在果实感病的全程都起抑制病斑扩展的作用。接种病原菌后的果实中的 POD、SOD 和 CAT 的活性均显著高于对照, 且在观测期分别呈现活性高峰, 说明鸭梨果实中这些酶在逆境条件下能最大限度地被激发, 减轻病害侵染造成的伤害。

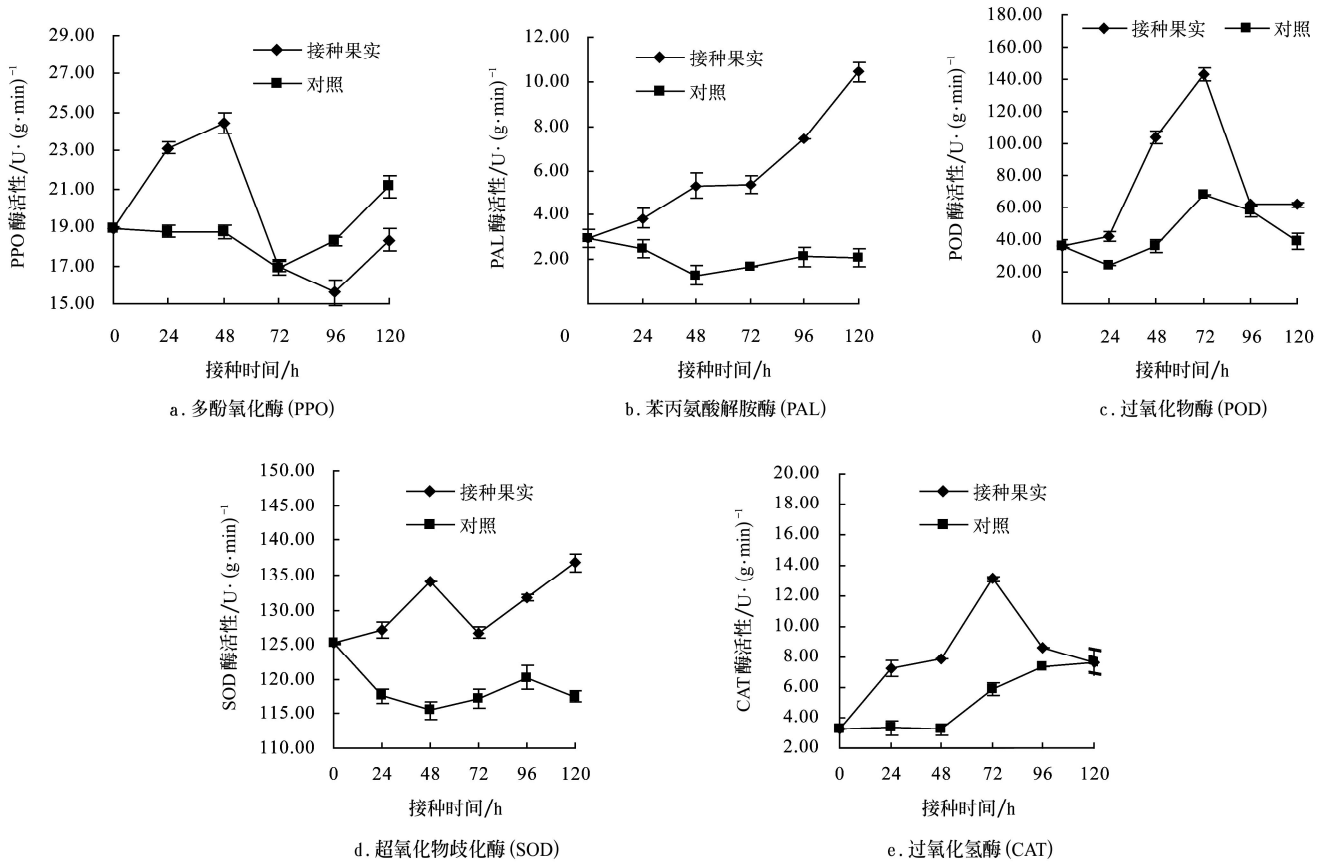


图 1 接种轮纹病后鸭梨果肉中 5 种酶的活性变化

Fig.1 Changes of the activity of five enzymes in 'Ya' pear fruit after inoculation with *B.berengriana*

2.2 梨果实生长期 5 种防御酶活性的变化

图 2 为未受病菌侵染的鸭梨果实在不同发育期的 5 种防御酶活性变化。除 SOD 酶外，其他 4 种酶在果实发育初期都表现出较高活性，并且随着果实的生长发育，酶的活性总体逐渐降低，其中 POD 和 CAT 在盛花后 95 d 后活性降得很低。说明这 4 种酶在幼果期的活性处于最高期。SOD 酶活性在幼果期极低，仅有 8.13 U/(g·min)，而在花后 75 d 呈急剧上升趋势，花后 115 d 至果实成熟活性始终保持在 90.59~93.83 U/(g·min)。在鸭梨果实发育的初期 PPO、PAL、CAT 和 POD 活性处于最高值，说明在果实幼果期这 4 种酶与抗病性相关。而在幼果期以后，这几种酶的活性总体偏低，在近成熟期主要是 SOD、PPO 和 PAL 3 种酶活性较高。根据通讯作者试验室对鸭梨轮纹病潜伏侵染期田间实验结果显示，鸭梨轮纹病侵染高峰期为盛花期后 50~70 d，在整个生长期病害极少发生^[19]。有研究表明，皮孔是果实病菌侵入的主要途径和潜伏的主要部位，而在幼果期果实的皮孔密度较大，其次是膨大期^[9]。本研究表明鸭梨果实在幼果期活性较高的是 PPO、POD、CAT 和 PAL 这 4 种酶。其中 PPO 和 PAL 活性最高，且活性峰值出现早于 POD，这些酶活性与果实幼果期抗病性呈正相关。故在幼果期病原菌虽容易侵入但病情不易扩展，可能与果实抵抗病原菌的防御酶活性较高有关。鸭梨果实

在花后 55~95 d，果实中与抗性相关酶活性总体呈下降趋势，在花后 75 d 这 5 种酶总活性处于最低值，这个时期病原菌较易侵入且不能抵抗病情的扩展。鸭梨果实在近成熟期（花后 95~105 d）主要与抗病性相关的 SOD 和 PAL 2 种酶活性较强，在这期间果实中 SOD 活性的大幅度上升，PAL 活性也呈现先升后降趋势，可以有效的抑制病原菌的侵染，故在这个时期病情较膨大期扩展速度慢。以上结果表明，鸭梨果实中防御酶的活性变化与田间发病规律一致。在植物发育过程中，不同的阶段起主要作用的酶不同，

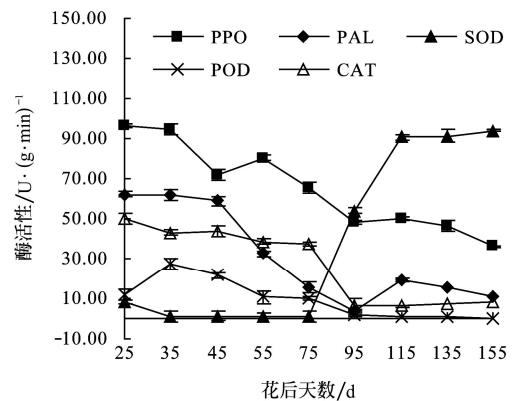


图 2 鸭梨果实生长期 5 种防御酶活性变化

Fig.2 Changes of defendant enzyme activities in 'Ya' pear fruit during growth

如猕猴桃软化的过程中就存在不同酶种类的阶段性变化^[20]。本研究表明,鸭梨果实幼果期与抗病性相关酶类主要有PPO、PAL和POD,并随着果实发育酶活性逐渐下降;果实近成熟期SOD酶活性显著提高,PAL在花后115 d也呈现出活性高峰。这两种酶对果实抵抗病菌起到一定作用。故不同的阶段与抗病性相关的防御性酶活性也呈现阶段性变化,并且在不同阶段主要防御酶种类和作用强弱是不同的。

2.3 鸭梨果实贮藏期5种防御酶活性的变化

图3为未受病原菌侵染的鸭梨果实在不同贮藏期的5种防御酶的变化。结果显示,鸭梨果实在贮藏期间活性较强的两种酶为PPO和SOD。其中PPO一个活性峰值(64.73 U/(g·min)),是采收时酶活性的1.8倍。SOD的活性由采收时的93.83 U/(g·min)降至60.52 U/(g·min)。其平均值为89.71 U/(g·min),是CAT和PAL酶活性的15~20倍。说明梨果实在贮藏期主要是SOD和PPO 2种酶活性较高,但总体防御酶活性明显低于采前,对抵抗病原菌的能力减弱。故在贮藏2个月后,随着鸭梨果实衰老速度加快,整体抗病性也进一步降低,在自然状态下潜伏侵入果实内部的轮纹病菌也能够果肉中生长繁殖,导致果实发病腐烂。通讯作者实验室对鸭梨果实采后轮纹病发病规律的研究结果表明田间自然侵染轮纹病果实在采后40~60 d集中发病^[19],此结果与果实在贮藏期的抗病性相关酶的活性变化规律相一致。

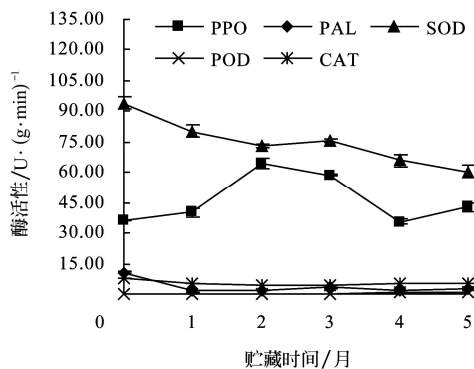


图3 鸭梨果实贮藏期5种防御酶活性变化
Fig.3 Changes of defense enzyme activities in 'Ya' pear fruit during storage

3 结论

1) 鸭梨果实受病原菌侵染后,PPO活性与鸭梨果实感病早期抗病性关系密切;PAL在感病的全程都起抑制病菌扩展的作用;接种轮纹病菌果实中的POD、CAT和SOD酶活性显著高于对照,与抵抗轮纹病的发生发展密切相关。

2) 鸭梨果实在幼果期(花后25~45 d)主要与抗病性相关酶是PPO、POD、CAT和PAL。在果实膨大期(花

后55~95 d),鸭梨果实中与抗病性相关酶活性总体呈下降趋势,在花后75 d这4种酶总活性处于最低值。梨果实在近成熟期(花后95~105 d)主要与抗病性相关的酶是SOD和PAL。果实在不同的阶段与抗病性相关的防御性酶活性也呈现阶段性变化,并且在不同阶段主要防御酶种类和作用强弱是不同的。

3) 鸭梨果实在贮藏期间,PPO的活性在前2个月有一定幅度增加,而后迅速下降至最低值。其它4种与抗病性相关的酶活性总体呈降趋势,鸭梨果实在贮藏2个月后,整体抗病性也进一步降低,在自然状态下受病原菌侵染的果实容易发病腐烂。以上结论基本探清了在果实在生长期的不同阶段和采后贮藏过程中防御酶系变化与抵抗轮纹病的关系,为果实田间生长和采后贮藏的病害防治提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 薛莲,檀根甲. 采后苹果果实轮纹病的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(6): 1227-1230.
- [2] Pring R J. A fine-structural study of the infection of leaves of *Phaseolus vulgaris* by redsores of *Uromyces phaseali* [J]. *Physiological Plant Pathology*, 1980, 17: 269-276.
- [3] Ye X S, Deverall B J. Effects of heat treatment or mixed inoculation on the development of compatible and incompatible bean rust infections [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34: 427-437.
- [4] Bell A A. Biochemical mechanisms of disease resistance [J]. *Annu Rev Plant Pathol*, 1986, 32: 21-81.
- [5] Mozzetti C. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspension as markers of incompatibility in different phytophthora pepper interactions[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, 46: 95-107.
- [6] 吴芳芳,檀根甲. 苹果感染炭疽病菌后6种酶活性的变化[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(1): 46-50.
- [7] Wood R K S. *Physiological plant pathology* [M]. Oxford: Blackwell Scientific Publi Ltd, 1967.
- [8] 李广旭,沈永波,高艳敏,等. 苹果轮纹病原菌侵染机制的研究[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 16-20.
- [9] 刘海英,李川,范永山,等. 影响苹果果实轮纹病抗病性的寄主因素及相关性分析[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(1): 56-60.
- [10] 方中达. 植病研究方法(第3版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 137-139.
- [11] Gsleszzi M A M, Sgsrbieri V, Costantinides S M. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase from drarf variety of banana (*Musa cavendishii*) [J]. *J Food Sci*, 1981, 46: 150-155.
- [12] 吴锦程,陈群,唐朝晖,等. 外源水杨酸对冷藏枇杷果实木质化及相关酶活性的影响[J]. 农业工程学报, 2006, 22(7): 175-179.
- [13] 李江华,王贵禧,梁丽松,等. 桐柏大枣气调贮藏期间几种酶活性变化[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 234-237.

- [14] 潘瑞炽. 植物生理学(第4版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [15] 李广旭, 杨 华, 高艳敏, 等. 轮纹病菌对不同抗性苹果品种防御酶的影响[J]. 果树学报, 2005, 22(4): 416—418.
- [16] 贺忠群, 贺超兴, 张志斌, 等. 不同基质接种丛枝菌根真菌对番茄生长及PAL、PPO 酶活的影响[J]. 农业工程学报, 2005, 20(12): 169—172.
- [17] 芦光新. 活性氧与植物抗病性的关系[J]. 青海大学学报, 2002, 2: 12—15.
- [18] 罗自生, 徐晓玲, 蔡侦侦. 热激减轻柿果冷害与活性氧代谢的关系[J]. 农业工程学报, 2007, 23(8): 249—252.
- [19] 王艳娜. 梨果实轮纹病发病过程中寄主—病原菌互作机理[D]. 北京: 中国林业科学研究院林业研究所, 2007.
- [20] 苍 晶, 王学东, 王军虹, 等. 狗枣猕猴桃果实软化过程中阶段性专一酶的研究[J]. 果树学报, 2001, 18(5): 284—287.

Changes of defense enzyme activity in ‘Ya’ pear fruit inoculated with *Botryosphaeria berengriana* during growth and storage periods

Zhu Meiyun¹, Zhao Xiaofang^{1, 2}, Wang Guixi^{2*}, Wang Yanna², Liang Lisong²

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Silviculture of State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract : The activities of Polyphenoloxidase (PPO), Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL), Peroxidase (POD), Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) in ‘Ya’ pear fruit inoculated with *Botryosphaeria berengriana* f.sp. *piricola* and sound pear fruit in growth and storage periods were studied. The results show that compared with the uninoculated pear fruit, the PPO activity of the pear fruit inoculated by the pathogen markedly increase in 48 hours after the inoculating treatment, the PAL activity is on the rise during the 120 hours after inoculation, POD and CAT activities reach a peak at 72h after inoculation, and the SOD activity of the inoculated treatment is also obviously higher than that of the contrast, which suggests that those enzymes are closely-related to pear fruit against *Botryosphaeria berengriana* f.sp. *piricola* infection. The main defense enzymes at the young stage of pear fruit are PPO, POD, PAL and CAT, which activities are higher at 25~75 d after blossom, and lower from then on; The main defense enzymes with high activity at the premature stage of pear fruit are SOD and PAL. In addition, the activity of SOD heightens sharply at 75 d after blossom, peaks at mature stage of fruit. And the activity of PAL appears a little peak at 115 d after blossom. The activities of these enzymes all declines during storage period, and the ability to resist the growth of pathogen reduces sharply. The disease resistance of pear fruit during different periods concerns the defense enzymes activity very nearly.

Key words: ‘Ya’ pear fruit; *Botryosphaeria berengriana* f.sp. *piricola*; defense enzymes; period of growth; period of storage