冷激及H_2O_2处理对采后番茄果实抗病性的诱导

王 菲，生吉萍，范 蓓，于萌萌，申 琳*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083)

摘 要：以番茄果实为试材，研究冷激对采后番茄果实抗病性的影响以及H_2O_2在其中的作用。结果表明，冷激提高了番茄果实的抗病指数，诱导了冷藏初期番茄果实中H_2O_2含量的升高和谷胱甘肽转移酶活性的提高，并且诱导了抗病相关酶苯丙氨酸解氨酶(PAL)，几丁质酶和β-1,3葡聚糖酶的活性增加。外源H_2O_2处理可以促进冷激诱导的果实内H_2O_2含量的升高和谷胱甘肽转移酶的提高，并且促进抗病相关酶活的诱导，而外源抑制H_2O_2会使诱导作用大大减弱。由此得出结论，冷激可以诱导采后番茄果实的抗病性，提高抗病相关酶活，H_2O_2参与了冷激介导的抗病性增强。

关键词：番茄；冷激；病害；H_2O_2；抗病相关酶

Induced Disease-resistance of Postharvest Tomato by Cold-shock and H_2O_2 Treatment

WANG Fei, SHENG Ji-ping, FAN Bei, YU Meng-meng, SHEN Lin*
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The effects of hydrogen peroxide on the induced disease-resistance of tomato fruits by cold-shock treatment were studied. Cold-shock treatment could induce the disease-resistance of tomato fruits, enhance the endogenous H_2O_2 content in the beginning of storage and increase the activity of GST. Furthermore, cold-shock could induce the activities of some anti-disease enzymes, including PAL, chitinase and β-1,3 glucanase. The inducement of H_2O_2 content and activity of GST could be accelerated by pretreatment with H_2O_2 before cold-shock, which promoted the induction of anti-disease enzyme activities. All of the inductions were inhibited by pretreatment with dimethylthiourea before cold-shock. In conclusion, the cold-shock treatment could induce the disease-resistance of postharvest tomato fruits, and hydrogen peroxide played an important role in the progress.

Key words: tomato; cold-shock; disease; hydrogen peroxide; anti-disease enzyme
中图分类号：TS205.9 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0453-04

病害为果蔬采后贮运带来了巨大损失，解决好病害问题是果蔬采后贮藏的关键。国内外研究表明冷激可以通过调控抗病相关基因的表达而提高果蔬的抗病性，包括H_2O_2在内的一些重要信号分子在其中发挥着重要的作用[1-2]。已有研究表明H_2O_2的产生是植物抗病早期反应之一，细菌、真菌、激发子等均可诱导植物体内H_2O_2的产生[3]，进而H_2O_2作为第二信使调控抗性相关基因的表达，最终通过影响抗性蛋白物质的产生而帮助植物体抵抗病菌的侵害[4]。有研究表明在拟南芥中，H_2O_2可以诱导苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的表达，从而大大提高拟南芥对病原菌的抵抗能力[5]。然而对于冷激处理是否通过调节H_2O_2的含量而影响采后番茄果实的抗病性还没有报道。

本实验研究了冷激处理对番茄果实抗病性的诱导，同时引入外源H_2O_2及其抑制剂DMTU的处理，通过测定抗病相关酶活的水平，研究这种重要的信号分子是如何参与上述的生理生化过程，从而为果蔬采后抗病保鲜技术的研究提供新的证据和理论支持。

收稿日期：2007-11-30
基金项目：国家自然科学基金项目(30671471；30571296)
作者简介：王菲(1983-)，女，硕士，研究方向为食品生物技术。E-mail：wf_cau@163.com
*通讯作者：申琳(1964-)，男，副教授，研究方向为果蔬采后生理与生物技术。E-mail：pingshen@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

绿熟期番茄(品种：918号)，采自北京郊区土井村；

病原菌 本实验室自行从病害番茄果实表面分离出的灰霉(*Botrytis cinerea Pers*)。

1.2 试剂

二甲基硫脲(DMTU) Sigma公司；ST-GST试剂盒 南京建成生物工程公司。

1.3 方法

1.3.1 番茄果实的采集和贮藏

采收绿熟期(花期40d左右，番茄果实已经充分膨大，但果皮全为青绿色，即为mature green)、大小均匀、成熟度相对一致、无病虫害、无机械伤的918号番茄。贮藏条件为温度20℃，维持湿度90%。

1.3.2 番茄处理方法

冷激：以0℃的冰水混合物为冷却介质，用0.01mm的聚乙烯薄膜袋包装番茄，排出袋内气体并封口，将果实完全浸入冰水中，冷激2.5h，处理完毕后，在自然状态下充分晾干。

H_2O_2结合冷激处理：番茄果实放入盛有10mmol/L H_2O_2溶液的大型干燥器中，用真空泵抽真空，达到-0.04MPa的压强后保持30s，真空渗透后在常压下浸透2min，进行溶液与果实之间的固相和液相之间的平衡，自然晾干，之后冷激处理，置于清洁塑料筐中贮藏。

DMTU结合冷激处理：番茄果实放入盛有5mmol/L DMTU溶液的大型干燥器中，用真空泵抽真空，达到-0.04MPa的压强后保持30s，真空渗透后在常压下浸透2min，进行溶液与果实之间的固相和液相之间的平衡。自然晾干，之后冷激处理，置于清洁塑料筐中贮藏。

病原菌接种处理：绿熟期番茄表面用75%的酒精消毒，晾干后用灭菌大头针在每个番茄腔室部位均匀扎3到4个小孔，放置1h后用移液器注入浓度为5×10^5CFU/ml的病原菌悬浮液5μl，用塑料袋封口后贮存。

1.3.3 H_2O_2含量及抗病相关酶活测定方法

番茄果实抗病相关酶活苯丙氨酸解氨酶(PAL)测定参照何钟佩[6]方法，以在相应的反应条件下每分钟每克鲜重OD值每变化0.01所需的酶量为一个酶活单位。几丁质酶活测定参照蒋跃明方法[7]，以反应条件下每克鲜重分解胶状几丁质产生1μg N-乙酰氨基葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活单位。β-1,3葡聚糖酶测定参照《现代植物生理实验指南》中的方法[8]，以反应条件下，每克鲜重产生0.01μg葡萄糖的酶量定义为一个酶活单位。H_2O_2含量测定参照Brennen方法[9]，H_2O_2清除酶谷胱甘肽-S转移酶酶活使用ST-GST试剂盒测定。

2 结果与分析

2.1 冷激与H_2O_2及DMTU结合处理对番茄果实抗病性的影响

冷激处理、H_2O_2结合冷激处理以及DMTU结合冷激处理后番茄果实接种病原菌室温贮藏，未处理后接种病原菌的果实作为对照。4d后观察发病情况，用直尺测量病斑直径，计算防治效果。

$$\text{防治效果}(\%)=\frac{\text{对照病斑直径}-\text{处理病斑直径}}{\text{对照病斑直径}}\times100$$

结果表明，冷激可以较大程度的提高番茄果实的抗病性，防治效果达到20.4%，外源H_2O_2可以促进诱导效果的增强，防治效果达到23.6%，抑制番茄体内H_2O_2会削弱防治效果。结果如表1所示。

表1 不同处理方式番茄果实对病原菌的防治效果

Table 1 Effects of control of *Botrytis cinerea* on tomatoes under different treatments

处理方式	对照	冷激2.5h	H_2O_2+冷激处理	DMTU+冷激处理
防治效果(%)	0	20.4	23.6	11.0

表1表明，冷激处理确实能够提高番茄果实的抗病能力，并且H_2O_2的确参与其中。

2.2 冷激与H_2O_2或DMTU结合处理对番茄果皮中H_2O_2含量及H_2O_2清除酶GST的影响

2.2.1 贮藏期间番茄果皮H_2O_2含量的变化

由图1可见，对照番茄在贮藏期间H_2O_2含量先缓慢上升然后降低。冷激处理的番茄H_2O_2含量在第1d急剧升高，是对照的1.4倍，之后逐渐降低，从第3d后一直低于对照。H_2O_2加冷激处理的番茄果实在前两天出现H_2O_2含量的显著升高，第2d达到峰值，为对照的1.5倍，此后缓慢下降但一直维持高于对照的H_2O_2含量。而DMTU加冷激处理后的番茄果实，H_2O_2含量在贮藏前期始终维持比对照低的水平，维持缓慢上升的趋势，并

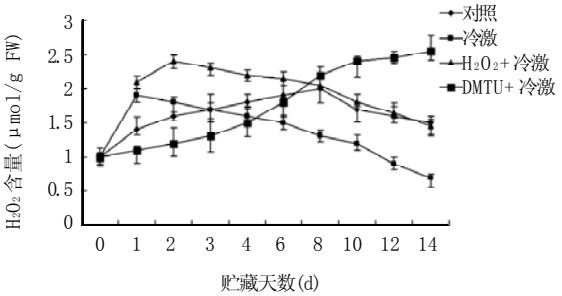


图1 贮藏期间不同处理番茄果皮H_2O_2含量的变化

Fig.1 H_2O_2 content of tomato fruit pericarp under different treatments during storage

从第7d开始高于对照。可见冷激可以在贮藏初期诱导H_2O_2的表达，从而在其下游调控抗病相关的生理生化反应，提高果实抗病性，外源H_2O_2可以很大程度的促进诱导，DMTU会削弱诱导现象。

2.2.2 贮藏期间番茄果皮GST酶活性变化

谷胱甘肽S转移酶GST可以催化活性氧与谷胱苷肽巯基共价结合，从而避免植物体受到内源或外源活性氧的侵害。已有研究表明，活性氧可以诱导GST表达，因此番茄体内GST酶活性的高低可以间接表明体内H_2O_2水平及其代谢途径[10]。由图2中可以看出，对照番茄GST酶活呈整体下降趋势，并在第8d有一个小幅度上升。冷激处理的番茄GST酶活在第1d显著上升，达到对照的1.4倍，之后下降，但始终比对照水平高。H_2O_2结合冷激处理的番茄果实酶活变化趋势与冷激番茄相同，但上升幅度明显加大，第1d峰值为对照的1.7倍。但是DMTU结合冷激处理的番茄GST酶活趋势有所不同，在第1d下降，之后升高。由此可见冷激可以在番茄贮藏初期较大程度的诱导GST酶活，外源H_2O_2可以极大促进酶活的诱导，外源抑制H_2O_2后，诱导现象消失。结果表明贮藏期间番茄果皮GST酶活与H_2O_2含量的变化趋势一致。

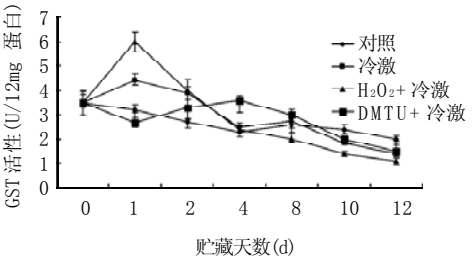


图2 贮藏期间不同处理番茄果皮GST活性变化

Fig.2 GST activities of tomato fruit pericard with different treatments during storage

2.3 冷激与H_2O_2或DMTU结合处理对番茄果皮抗病相关酶活的影响

2.3.1 各种处理对番茄果实PAL酶活的影响

苯丙氨酸解氨酶PAL是苯丙氨酸类代谢途径的定速酶，催化产生植保素、木质素等多种与植株抗病性相关的终产物，从而使植株产生抗病性[11]。由图3可见，冷激处理后的番茄果实与对照相比，PAL酶活有较大程度的提高，在第4d达到最高值11.1U，是对照的1.7倍，之后逐渐降低，但始终保持高于对照的水平。H_2O_2结合冷激处理的番茄果皮PAL酶活的升高幅度大于单独用冷激处理的番茄，PAL酶活也在第4d达到峰值12.8U，是对照的2.0倍。而用DMTU处理后的番茄果实与对照相比无明显差异。

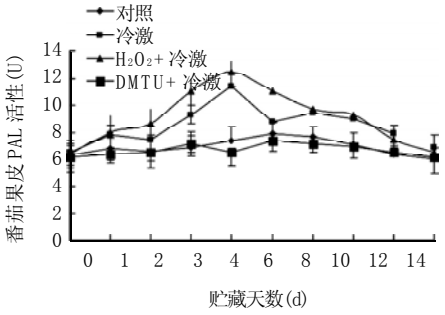


图3 贮藏期间不同处理番茄果皮PAL酶活变化

Fig.3 PAL activities of tomato fruit pericard with different treatment during storage

2.3.2 各种处理对番茄果皮几丁质酶活的影响

几丁质是真菌细胞壁的组成部分，几丁质酶可以消化病原菌细胞壁，帮助番茄果实抵抗病原菌的进攻[12]。图4所示，冷激处理后的番茄果皮几丁质酶活性迅速上升，在第2d达到峰值10.9U，是对照的1.5倍。H_2O_2结合冷激处理后番茄果实的几丁质酶活性上升的幅度要大于冷激单独处理的果实，在第2d达到峰值12.8U，是对照的1.7倍，并在贮藏期间酶活始终高于冷激单独处理的果实。DMTU结合冷激处理的番茄果实与对照相比，几丁质酶活无明显差异。

2.3.3 不同处理对番茄果实β-1,3葡聚糖酶活的影响

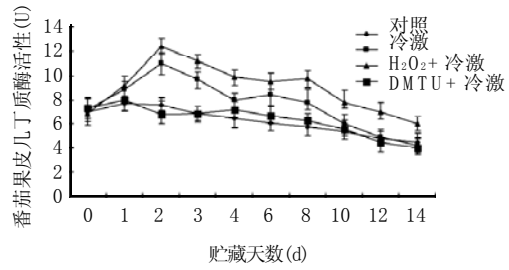


图4 贮藏期间不同处理番茄果皮几丁质酶活变化

Fig.4 Chitinase activities of tomato fruit pericard with different treatment during storage

β-1,3葡聚糖同样是真菌细胞壁的组成部分，β-1,3葡聚糖酶可以帮助消化病原菌细胞壁，因此其活性同样体现了番茄果实抗病性的强弱[13]。如图5结果显示，冷激处理的番茄果实β-1,3葡聚糖酶活有一定程度的提高，在第2d达到最大值10.2U，是对照的1.2倍，而H_2O_2处理后的番茄果实再经过冷激后，β-1,3葡聚糖酶活可在第3d达到11.8U，是对照的1.4倍。DMTU结合冷激处理后的番茄果实与对照相比，β-1,3葡聚糖酶活无明显的升高，但是在贮藏后期，始终保持比对照略高的水平。

由以上结果可以看出冷激处理可以在番茄果实贮藏

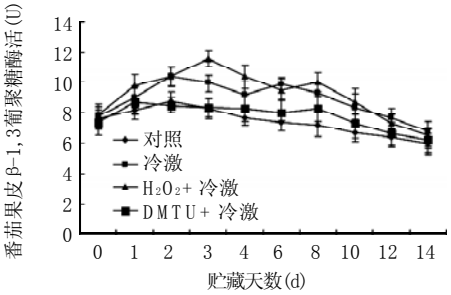


图5 贮藏期间不同处理番茄果皮β -1,3葡聚糖酶活变化

Fig.5 β-1,3 glucanase activities of tomato fruit pericard with different treatments during storage

初期诱导与抗病密切相关的PAL，几丁质酶和β -1,3葡聚糖酶活性的提高，从而使番茄提高抵御病原菌侵害的能力。外源施加H_2O_2可以使酶活诱导的趋势加强，抑制体内H_2O_2会使诱导能力大大减弱。可见H_2O_2在抗性酶活诱导过程中起到重要的作用。

3 讨 论

已有研究表明冷激处理可以增强番茄果实的抗逆性。本实验表明，冷激这种采后处理方法同样可以提高果实抗病性，并且这种抗病性的提高与番茄体内H_2O_2的含量有密切关系。冷激可以瞬时提高番茄果实H_2O_2的含量，并使得其下游与代谢、信号传导密切相关的GST酶活上升。前人研究表明H_2O_2作为植物的第二信使，在多种生物及非生物胁迫的信号转导中起到十分重要的信号转导作用。它在信号转导中调控下游信号流，进而激活和调控植物体内各种胁迫相关基因，并将信号最终放大为蛋白的翻译表达，在植物体中即为产生各种抗性相关物质。由此推断冷激通过调控信号分子H_2O_2的含量而影响抗病物质的产生，并且这种信号分子的下游传递与谷胱甘肽途径有关。

抗性酶活的测定结果支持了这一推测。PAL是植物苯丙烷类代谢途径的关键酶，参与合成重要的抗病相关次生产物。几丁质和β-1,3葡聚糖是病原菌细胞壁的重要组成成分，可分别被几丁质酶和β-1,3葡聚糖酶分解，从而抑制病原菌的生长。因此这三种酶活水平，可以直接证明果实的抗病能力。实验结果表明，冷激可以在贮藏初期极大的诱导抗病相关酶活的增加，在后期使酶活始终保持高于对照的水平，并且这种趋势与番茄体内H_2O_2水平的变化同步。外源抑制H_2O_2的含量使得冷激对酶活的诱导受到抑制，但在贮藏后期这种抑制会逐渐减弱。由此可以得出结论冷激诱导的抗性相关酶增加是可以通过H_2O_2的信号传导途径进行调控的。但对于其具体的下游信号传递途径以及该途径是否与GST参与的谷胱甘肽途径密切相关还需要进一步研究。

之前研究表明，H_2O_2参与了冷激诱导的番茄果实抗冷性提高，结合本实验可推断，H_2O_2可能是番茄对病害和冷害交叉抗性中的关键因子，但对于其在交叉抗性中的具体作用机制尤其是基因调控手段还有待近一步研究。

参考文献：

[1] GRANT J J, LOAKE G J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance[J]. Plant Physiology, 2000, 124: 21-29.

[2] KOVTUN Y, CHIU W L, TENA G, et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants[J]. PNAS, 2000, 97: 2940-2945.

[3] NURNBERGER T, NENNATIEL D, JABS T. High affinity binding of a fungal oligoeptide elicitor to parsley plasma membrane triggers multiple defense responses[J]. Cell, 1994, 78: 449-460.

[4] XIONG L M, SCHUMAKER K S, ZHU J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress[J]. The Plant Cell, 2002, 14: 165-183.

[5] DESIKAN R, REYNOLDS A, HANCOCK J T, et al. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis suspension* cultures[J]. Biochemical Journal, 1998, 330: 115-120.

[6] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1993: 11-14.

[7] 蒋跃明, 马国华, 陈芳. 芒果采后潜伏真菌活化与几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶的研究[J]. 植物保护学报, 1995, 22(1): 80-84

[8] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[9] BRENNAN T C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear[J]. Plant Physiol, 1977, 59(2): 411-416.

[10] ROUHIER N, VILLAREJO A, SRIVASTAVA M, et al. Identification of plant glutaredoxin targets[J]. Antioxid Redox Signal, 2005(2): 919-929.

[11] AHL-GOY P, SIGNER H, REIST R, et al. Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid Nicotiana glutinosa Ni-coti-anadebneyi[J]. Planta, 1993, 191: 200—206.

[12] CASTORIS R, CURTIS F D, LIMA G, et al. Aureobasidium pullulans (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action[J]. Postharvest Biol Technol, 2001, 22(1): 1-17.

[13] JIJAKLI M H, KEPOIVRE P. Characterization of an exo-β-1,3-glucanase produced by pichia anomala strain K. antagonist of *Botrytis cinerea* on applies[J]. Biol Control, 1998, 88: 335-343.